

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında  
Orcan DEMİRCAN Tarafından Hazırlanan**

**KAĞIT HAMURU SİYAH LİKÖRÜNÜN BİYOREMİDİASYONUNDA BAZI *BACILLUS*  
SUŞLARININ KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

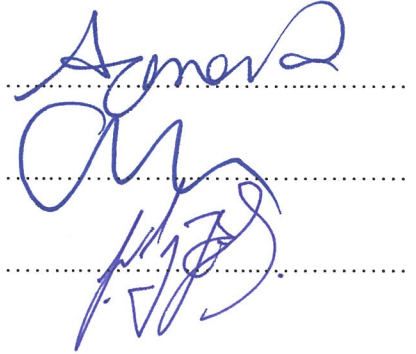
**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 28 / 05 / 2019 gün ve 1806 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ**

**Üye : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI**

**Üye : Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ**



**Prof. Dr. Asim KADIOĞLU**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Kâğıt Hamuru Siyah Likörünün Biyoremediasyonunda Bazı *Bacillus* Suşlarının Kullanımının Araştırılması” konulu bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji ABD, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’nda Yüksek Lisans çalışması olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek tez konumun seçilmesi, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen saygı değer hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarıyla bana destek olan Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji ABD, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı’nda başta Dr. Ayşegül ÖZER, Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK, Dr. Öğr. Üyesi Uğur UZUNER olmak üzere tüm çalışanlara, çalışmamda kullandığım kızılçam siyah likörünü temin ettiğim Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği ABD Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Hüseyin KIRCI’ya ve laboratuvarındaki çalışanlara ve son olarak, maddi ve manevi olarak tüm desteklerini arkamda hissetmiş olduğum aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Orcan DEMİRCAN  
Trabzon 2019

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Kâğıt Hamuru Siyah Likörünün Biyoremediasyonunda Bazı *Bacillus* Suşlarının Kullanımının Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda gerçekleştirdiğimi, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 28/06/2019

Orcan DEMİRCAN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Kâğıt, Karton ve Kâğıt Hamuru Endüstrisinin Türkiye’deki Durumu .....	4
1.3. Kâğıt ve Kâğıt Hamurunun Yapısı .....	7
1.4. Kâğıt ve Kâğıt Hamurunun Degredasyonunda Görev Alan Enzimler .....	11
1.5. Peroksidazlar .....	14
1.6. Çalışmanın Amacı .....	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	19
2.2. Kullanılan Mikroorganizmalar .....	19
2.3. Araştırma Materyali.....	19
2.4. Optimizasyon Çalışmaları .....	20
2.4.1. Kullanılan Besiyerleri.....	20
2.4.2. Siyah Likörün Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	20
2.4.3. CFU Analizleri .....	20
2.4.4. Karbon Kaynağının Belirlenmesi .....	21
2.4.5. Azot Kaynağının Belirlenmesi .....	23
2.4.6. Renk Tayini .....	25
2.4.7. Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi.....	25
2.4.8. Lignin Degredasyon Zonunun Gözlenmesi .....	26
2.4.9. Proteinlerin Elde Edilmesi.....	26

2.4.10.	Protein Konsantrasyon Tayini .....	27
2.4.11.	DyP-tipi Peroksidaz Enzimi İçin Zimogram Analizi .....	27
2.5.	Moleküler Çalışmalar .....	28
2.5.1.	Primer Sentezi.....	28
2.5.2.	Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu .....	28
2.5.3.	DyP-tipi Peroksidaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi .....	29
3.	BULGULAR .....	32
3.1.	Karbon Kaynağını ve Optimum Konsantrasyonunu Belirlemek İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmaları .....	32
3.2.	Azot Kaynağını ve Optimum Konsantrasyonunu Belirlemek İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmaları .....	36
3.3.	Lignin Degredasyonunun Belirlenmesi .....	40
3.4.	Lignin Degredasyon Zonunun Gözlenmesi.....	41
3.5.	<i>B. megaterium</i> ve <i>B. licheniformis</i> Türlerine Ait DyP-tipi Peroksidaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve pGEM®-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	42
3.6.	DyP-tipi Peroksidaz Enzimi İçin Zimogram Analizi .....	44
4.	TARTIŞMA.....	46
5.	SONUÇLAR.....	51
6.	ÖNERİLER .....	52
7.	KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

KÂĞIT HAMURU BLACK LİKÖRÜNÜN BİYOREMİDİASYONUNDA BAZI  
BACİLLUS SUŞLARININ KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Orcan DEMİRCAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI  
2019, 60 Sayfa

Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, dünyadaki en büyük ve aynı zamanda en kirletici endüstrilerden birisi olarak kabul görmektedir. Kâğıt ve kâğıt hamuru üretimi sonucunda açığa çıkan ve yüksek pH, KOİ ve BOİ'ye sahip bir atık su olan siyah likör, çevre açısından son derece tehlikeli ve organizmalar üzerinde genotoksik, kanserojenik ve klastojenik etkilere sebebiyet veren bir kirleticidir. Bu açıdan çalışmada kullanılan *Bacillus megaterium* ve *Bacillus licheniformis* bakterilerinin, bu atık suyun biyoremediasyonunda potansiyel birer organizma oldukları düşünülmektedir.

Optimum koşullarda ve negatif kontrolle kıyaslandığında *B. megaterium* ve *B. licheniformis* bakterilerinin sırasıyla, ~%11 ve ~%16 oranında rengi giderdiği ve ~%13 ve ~%14 oranında lignini degrede ettiği tespit edilmiştir. Maksimum renk giderimi ve lignin degradasyonu 72 saat sonunda kızılçam siyah likörüyle gerçekleştirilen altı günlük optimizasyon çalışmaları neticesinde tespit edilmiştir. Ayrıca, bu bakterilerdeki lignolitik potansiyelin varlığı moleküler düzeyde yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır. Bu bakterilere ait DyP-tipi peroksidaz enzimleri klonlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoremediasyon, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, Siyah likör, DyP-tipi peroksidaz



Master Thesis

SUMMARY

STUDIES ABOUT USING OF SOME BACILLUS STRAINS IN THE  
BIOREMEDIATION OF PULP BLACK LIQUOR

Orcan DEMİRCAN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Sabriye ÇANAKÇI  
2019, 60 Pages

The paper and pulp industry is recognized as one of the largest and also the most polluting industries in the world. Black liquor which is a wastewater with high pH, COD and BOD and produced by paper and pulp industries, is a pollutant which is very dangerous for the environment and causes genotoxic, carcinogenic and clastogenic effects on organisms. In this respect, *Bacillus megaterium* and *Bacillus licheniformis* bacteria used in this study are thought to be potential organisms in bioremediation of this wastewater.

It was determined that *B. megaterium* and *B. licheniformis* bacteria were removed color by ~11% and ~16% and degraded lignin by ~13% and ~14%, respectively, under optimum conditions and compared to the negative control. Maximal decolorization and degradation was observed after 72 cultivation hours mostly by the six-day optimization studies with red pine pulp black liquor. In addition, the presence of lignolytic potential in these bacteria was investigated with zymography and molecular studies. DyP-type peroxidase enzymes in these bacteria were cloned.

**Keywords:** Bioremediation, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, Black liquor, DyP-type peroxidases

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Küresel düzeyde endüstrilerin atık su üretim düzeyleri .....	2
Şekil 2. 2010-2017 yıllarında bazı ülkelere ait kâğıt ve kâğıt hamuru üretim rakamları.....	5
Şekil 3. Bitki biyokütlelerinde mevcut yapı maddelerinden lignin, hemiselüloz ve selülozun şematik gösterimi .....	8
Şekil 4. Koniferil, sinapil ve p-kumaril alkollerin aromatik yapıları ve bulundukları birimlerin şematik gösterimi .....	11
Şekil 5. DyP-tipi peroksidazların katalitik döngüsü .....	16
Şekil 6. %1 karbon kaynaklı %5 SL-MSM besiyerindeki <i>B. Licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> bakterilerinin CFU analizleri .....	34
Şekil 7. Değişen konsantrasyonlarda fruktozlu %5 SL-MSM besiyerindeki <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> bakterilerinin CFU analizleri.....	36
Şekil 8. %1 azot kaynaklı ve %1 fruktoz içeren %5 SL-MSM besiyerindeki <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> bakterilerinin CFU analizleri.....	38
Şekil 9. Değişen konsantrasyonlarda pepton içeren %1 fruktozlu %5 SL-MSM besiyerindeki <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> bakterilerinin CFU analizleri .....	40
Şekil 10. Optimum şartlarda <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> 'a ait lignin degradasyon sonuçları .....	41
Şekil 11. Metilen mavisi ve kraft lignin içeren LBM agar besiyeri üzerine ilave edilen <i>B. megaterium</i> ve <i>B. licheniformis</i> süpernatantlarının bir gün sonra oluşan zonlarının görüntüsü .....	41
Şekil 12. <i>B. megaterium</i> ve <i>B. licheniformis</i> bakterilerinin 42/45/47/50°C sıcaklıklarında gerçekleştirilen DyP-tipi peroksidaz geni için gradient PCR sonuçları.....	42
Şekil 13. <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> 'un TENS yöntemi ile izole edilen, DyP-tipi peroksidaz geni klonlanmış pGEM-T Easy klon plazmitlerinin görüntüsü .....	43
Şekil 14. Seçilen <i>B. licheniformis</i> 'e ve <i>B. megaterium</i> 'a ait DyP-tipi peroksidaz genlerini içeren pGEM-T Easy klonlarının <i>EcoRI</i> restriksiyon enzimi ile kesimleri .....	43
Şekil 15. <i>B. licheniformis</i> bakterisinin sırasıyla 24-144. saatleri arasında, MSM (1,3,5,7,9) ve %0,75 KL'li MSM (2,4,6,8,10) besiyerinde çoğaltıldıktan sonra elde edilen süpernatant örneklerinden yapılan DyP-tipi peroksidaz zimogram analiz sonuçları.....	44

Şekil 16. *B. megaterium* bakterisinin sırasıyla 24-144. saatleri arasında, MSM (1,3,5,7,9) ve %0,75 KL'li MSM (2,4,6,8,10) besiyerinde çoğaltıldıktan sonra elde edilen pellet örneklerinden yapılan DyP-tipi peroksidaz zimogram analiz sonuçları.....45



## TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Türkiye’deki kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ithalat ve ihracatın yıllara göre dağılımı.....	6
Tablo 2. Lignin birimlerinin basit yapıları ve farklı türlere göre dağılımları .....	10
Tablo 3. Bazı bakterilerden karakterize edilen DyP-tipi peroksidazların gösterimi.....	17
Tablo 4. Karbon kaynağını belirlemek için hazırlanan besiyerleri.....	22
Tablo 5. Karbon kaynağının konsantrasyonunu belirlemek için hazırlanan besiyerleri..	23
Tablo 6. Azot kaynağını belirlemek için hazırlanan besiyerleri .....	24
Tablo 7. Azot kaynağının konsantrasyonunu belirlemek için hazırlanan besiyerleri.....	25
Tablo 8. DyP-tipi peroksidaz genlerini çoğaltmak için kullanılan primerler .....	28
Tablo 9. <i>B. megaterium</i> ve <i>B. licheniformis</i> türlerine ait DyP-tipi peroksidaz genlerini çoğaltmak için gerçekleştirilen PCR şartları .....	30
Tablo 10. <i>B. megaterium</i> ve <i>B. licheniformis</i> türlerine ait DyP-tipi peroksidaz genlerini çoğaltmak için gerçekleştirilen PCR şartları .....	30
Tablo 11. <i>B. megaterium</i> ve <i>B. licheniformis</i> türlerine ait DyP-tipi peroksidaz genlerinin ligasyon prosedürü .....	31
Tablo 12. %1 karbon kaynaklı %5 SL-MSM besiyerindeki <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> ’a ait renk giderme yüzdeleri.....	33
Tablo 13. Değişen konsantrasyonlarda fruktozlu %5 SL-MSM besiyerindeki <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> ’a ait renk giderme yüzdeleri.....	35
Tablo 14. %1 azot kaynaklı ve %1 fruktoz içeren %5 SL-MSM besiyerindeki <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> ’a ait renk giderme yüzdeleri.....	37
Tablo 15. Değişen konsantrasyonlarda pepton içeren %1 fruktozlu %5 SL-MSM besiyerindeki <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. megaterium</i> ’a ait renk giderme yüzdeleri .....	39

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

°C	: Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
Abs	: Absorbans
APS	: Amonyum persülfat
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	: Alüminyum potasyum sülfat
BOİ	: Biyolojik oksijen ihtiyacı
BSA	: Sığır serum albümini
C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	: Amonyum tartarat
CFU	: Koloni sayımı
CoCl <sub>2</sub>	: Kobalt (II) klorür
CoSO <sub>4</sub>	: Kobalt (II) sülfat
CuSO <sub>4</sub>	: Bakır (II) sülfat
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
dk.	: Dakika
EC	: Enzim Komisyonu Numarası
ECF	: Elemental chlorine-free (Elementer klorsuz)
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FeSO <sub>4</sub>	: Ferröz sülfat
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	: Ferrik sülfat
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	: Borik asit
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Potasyum fosfat, dibazik
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Potasyum fosfat, monobazik
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
KL	: Kraft lignin
LB	: Luria-Bertani besiyeri
LBM	: Lignin bazal besiyeri
LiP	: Lignin peroksidaz
mA	: Miliamper

mM	: Milimolar
M	: Molar
MgSO <sub>4</sub>	: Magnezyum sülfat
MnP	: Mangan peroksidaz
MnSO <sub>4</sub>	: Manganez (II) sülfat
MSM	: Mineral salt medium
NaCl	: Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Sodyum bikarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Sodyum fosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Sodyum dihidrojen fosfat
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	: Sodyum molibdat
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na <sub>2</sub> S	: Sodyum sülfür
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	: Amonyum nitrat
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
Ör.	: Örnek
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppm	: Milyonda bir
RE	: Restriksiyon endonükleaz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SK	: Süspanse katı
SL	: Siyah likör
TCF	: Total chlorine-free (Tamamen klorsuz)
TEMED	: Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
v/v	: Hacimce yüzde derişim
VP	: Versatil peroksidaz
w/v	: Kütlece yüzde derişim
ZnSO <sub>4</sub>	: Çinko (II) sülfat

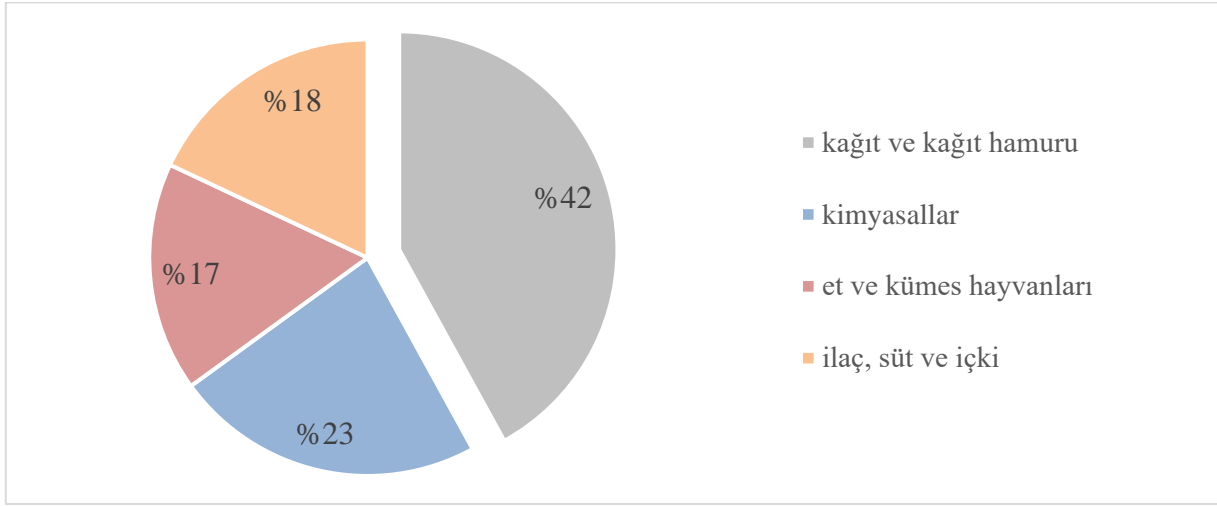
## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Keşfedilmesinden (M.Ö. 3700-3200) günümüze kadar olan süreçte kâğıt materyali, insan yaşamının vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Bununla birlikte, modern kâğıt yapma tekniklerinin giderek geliştirilmesi sayesinde, bir birey olarak bu eşi benzeri bulunmayan bu materyale ulaşmamız ucuz ve kolay olmuştur. Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, günümüz dünyasının en büyük endüstrilerinden biridir. Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO)'nun bünyesindeki İstatistik Birimi'ne ait verilere göre, 2017 yılında dünya genelindeki kâğıt ve karton üretimi 400 milyon tondan fazla ve kâğıt hamuru üretimi 180 milyon tonun üzerine çıkmıştır (URL-1, 2017). Kâğıt imalatı endüstrisinde başı Çin, kâğıt hamuru endüstrisinde ise başı Amerika Birleşik Devletleri çekmiştir (Chakraborty vd., 2019). Aynı şekilde, Avrupa'daki kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, dünya üretiminin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır ve bu endüstride, yıllık 100 milyon tondan fazla kâğıt ve karton ve 42 milyon tondan fazla kâğıt hamuru üretilmektedir (URL-2, 2017). Kâğıt ve karton üretiminin yanında ihracatında da başı Amerika Birleşik Devletleri çekmekteyken, kâğıt hamuru ihracatında ise başı Kanada almaktadır. Bununla birlikte FAO'nun verilerine dayanarak, 2015 yılında kişi başına düşen ortalama kâğıt tüketimi dünyada 57 kg iken, Avrupa birliği ülkelerinde 156 kg, Afrika ülkelerinde yedi kg, Japonya ve ABD'de ise 200 kg'dan fazladır (Atik ve Ok, 2017). Bu veriler baz alındığında, kâğıt tüketim oranları arz ve talepler doğrultusunda ve ülkelere göre değişiklik göstermektedir.

Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, aynı zamanda günümüz dünyasının en büyük kirleticilerinden biridir (Guo vd., 2016, Şekil 1). Öte yandan, giderek artmakta olan küresel nüfus ve bununla paralel olarak yakıt ve kimyasallara olan talebin artması, enerji güvenliği ve çevresel kaygılar gibi birçok toplumsal soruna yol açmaktadır (Wang vd., 2019). Kâğıt hamuru yapımı ve ağartma, kâğıt imalatında rol oynayan başlıca iki işlemdir. Kâğıt hamuru yapımında odun parçaları, lignin ve hemiselülozları selülozdan ayırmak için kimyasallar varlığında çok yüksek sıcaklıkta ve basınçta pişirilmektedir. Bu işlemin sonucunda, kraft

lignin, liginosülfonat, soda lignini ve ağartma işleminin sonucunda geride kalan ve farklı kimyasal özelliklere sahip çeşitli lignin formları üretilmektedir. Kirliliğin başlıca nedeni, endüstrinin hammadde olarak otsu ve odunsu her türden liginoselülozik bileşiklerin çok yüksek sıcaklıkta ve basınçta işlenmesi sonucu açığa çıkan, koyu kahverengi renge sahip ve siyah likör olarak tabir edilen atık sudan kaynaklanmaktadır.



Şekil 1. Küresel düzeyde endüstrilerin atık su üretim düzeyleri (URL-3, 2015).

Siyah likör (SL), kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinden açığa çıkan, koyu kahverengi renkli, güçlü koku yayan, yüksek başlangıç sıcaklığına ve yüksek alkali bir pH'a sahip, kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ;  $20 \times 10^4$  mg/L) ve biyolojik oksijen ihtiyacının (BOİ;  $40-50 \times 10^3$  mg/L) oldukça yüksek olduğu, toksik klorlu bileşikler, tanenler, reçine asitleri, sülfür bileşikleri, lignin ve lignin türevli ürünlerini içine alan süspanse katılardan (SK) oluşan toksik bir atık üründür (Sapapporn vd., 2009). Kâğıt hamuru işlemlerinde, karakteristik koyu renge yol açan kromoforik ve yüksek oranda oksitlenmiş polimerik lignin veya klorolignin türevleri meydana gelmektedir (Bergbauer vd., 1991). Ayrıca, kâğıt hamuru siyah likörü, yüksek miktarlarda lignin, hemiselüloz ve hümik asit gibi bileşiklerin yanı sıra  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , NaOH ve  $\text{Na}_2\text{S}$  gibi yüksek ölçüde bazik maddeler de içermektedir (Xiong vd., 2017, Tian vd., 2018). Bu bileşenlerden ötürü, bu atık su alkali bir yapıya sahiptir (pH aralığı 11-12). 1 ton kâğıt üretimi sırasında açığa çıkan SL miktarı, yaklaşık olarak 5 ila 150 m<sup>3</sup> arasındadır. Bu



değer kullanılan kâğıdın türüne, imalatta kullanılan materyalin karakteristik özelliklerine ve tekrar kullanılmak amacıyla geri dönüştürülen su miktarına göre değişmektedir (Pokhrel ve Viraraghavan, 2004; Doble ve Kumar, 2005). Bu değer modernleşen kâğıt hamuru ve kâğıt yongası endüstrilerinde, 1 ton kâğıt başına 10 ila 50 m<sup>3</sup>'lere kadar düşmektedir. Ancak, gelişmiş ülkelerde atık suyuna yapılan müdahaleler çok gelişigüzel ve bu atıklardan arıtılan suyun oranı çok düşük olduğundan dolayı, açığa çıkan kâğıt ve kâğıt hamuru atık su miktarı 3 milyar m<sup>3</sup>'ü bulmaktadır (Toczyłowska-Mamińska, 2017).

Bu koyu renkli atık suyun arıtılmadan veya kısmi arıtma sonucunda çevreye boşaltılmasıyla, su kaynaklarının istenmeyen şekilde koyu şekilde renklenmesinin yanında, ayrıca BOİ ve KOİ değerlerinde artışa, çözünmüş oksijen içeriğinin ve su bitkilerinin fotosentetik etkinliğinin azalmasına neden olabilir. Bu atık suda bulunan klorlu organik bileşiklere maruz kalan organizmalarda genetik mutasyonlar ve cilt bozuklukları gibi problemlerle karşılaşmaktadır. Bunun yanı sıra atık su, karasal ekosistemlerde toprağın ve topraktan elde edilecek mahsulün verimini azaltır ve eğer kirletici maddeler gıda zincirine girerse, insanlarda ve hayvanlarda genotoksik, klastojenik ve hatta kanserojenik etkilere sebebiyet verecektir (Zainith vd., 2019).

Bu belirtilen çevresel problemlerden dolayı, kâğıt imalat endüstrisinde çevre kirliliğinin ve toksik ve mutajenik klorlu organik bileşiklerin önüne geçmek için öncelikle ECF ağartma yöntemi geliştirilmiştir (EPA, 2003). Fakat bu yöntem klorlu organik bileşiklerin tamamen bertaraf edilmesine ön ayak olamamıştır. Bunun sonrasında oksijen, hidrojen peroksit, ozon ve perasetik asit gibi malzemelerin sürece katıldığı TCF ağartma yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem oluşan klorlu organik bileşiklerin tamamen ortadan kaldırılması için bir alternatif olmuştur (EPA, 2003). Ancak, bu yöntemin düşük pazar ihtiyacı, yüksek ağartma maliyetleri, düşük kâğıt hamur dayanıklılığı, heksenuronik asidin uzaklaştırılmasındaki düşüş ve ECF ağartma teknikleriyle karşılaştırıldığında kâğıdın parlaklığının daha çok kaybolması gibi sebeplerden dolayı 2010 yılında, dünya genelindeki kullanımları %5'in önüne geçememiştir (Miri vd., 2015). Bunun dışında, kâğıt ve kâğıt hamuru atık suyuna müdahalede geliştirilen birçok membran teknolojileri de bulunmaktadır. Nanofiltrasyon, membran filtrasyonu, ters osmoz veya membran biyoreaktörleri bunlardan en yaygın kullanılanlarıdır ve atık suyuna müdahalede bu yöntemlerin verimleri membran tipine, atık suyunun türüne ve kullanılan membran yöntemine göre artmaktadır (Gönder vd., 2012).

Ancak, membranların tıkanması bu yöntemlerde bir dezavantajdır. Aynı şekilde, elektrokimyasal veya ozonasyon ve Fenton süreci gibi gelişmiş oksidasyon teknolojileri de bulunmaktadır. Fakat atık suyuna müdahale esnasında gereken muazzam seviyedeki enerji ihtiyacı ve bu ihtiyacın doğurduğu aşırı maliyet bu tür yöntemlerin dezavantajıdır (Tunay vd., 2010).

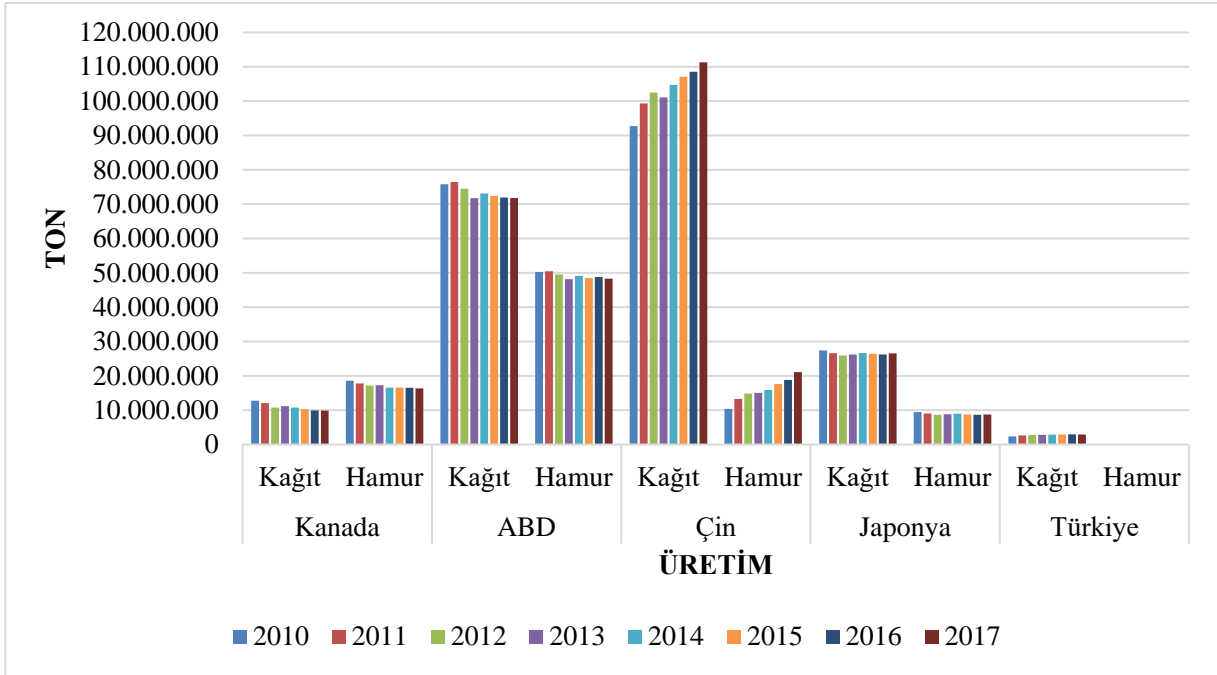
Fizikokimyasal müdahale süreçlerinin meydana getirdiği sekonder atık su kirleticilerinden kaçınmak, aşırı maliyetlerin ve dezavantajların önüne geçmek ve çevresel talepleri karşılamak için, organizmaların ürettikleri enzimlerin veya organizmanın kendisinin uygulandığı biyolojik arıtma metotları geliştirilmiştir. Ekosistemde büyük çapta dönüşümlere neden olan ana varlık mikroorganizmalardır ve bu dönüşümlerin gerçekleştiği metabolik süreçleridir. Bakteriler, funguslar veya algler gibi organizmaların kullanılması, çevre dostu ve maliyet bakımından ekonomik olmaları bu metotları daha cazip bir hale getirmektedir. Bu organizmalardan bilhassa bakteriler hem aerobik hem de anaerobik koşullarda çevre için toksik olan kimyasalları daha zararsız türevlerine dönüştürebilmektedir. Bununla birlikte, küçük genom büyüklüğüne sahip ve hücre yapıları bakımından basit olmaları; ayrıca kısa sürede genomik materyalini çoğaltabilmeleri, hızlı evrim geçirebilme ve değişen çevre koşullarına adapte olabilme yetenekleri, bakterileri çevre kirliliğine sebebiyet veren kimyasalların hem saha içi hem de saha dışında gideriminde, biyoremediasyon teknolojileri için daha uygun biyolojik adaylar haline getirmektedir (Dvořák vd., 2017).

## **1.2. Kâğıt, Karton ve Kâğıt Hamuru Endüstrisinin Türkiye'deki Durumu**

Dünya genelinde en çok kâğıt üretimine sahip olan Çin, aynı zamanda en çok kâğıt tüketimine sahip ülkeler arasındadır. Son yıllara ait verilerde Çin'de 100 milyon tondan fazla kâğıt üretimi ve 89 milyona yakın kâğıt tüketimi görülmektedir (Şekil 2).

Türkiye'de üretilen kâğıt miktarında son on yıl incelendiğinde önemli artışların olduğu görülmektedir. Özellikle 2010 yılına baktığımızda 2,4 milyon ton kâğıt üretimi varken, 2017 yılında bu miktar 3 milyona yaklaşmıştır. Öte yandan aynı durum kâğıt hamuru için söylenememektedir. Kâğıt hamuru üretiminde son on yılın verileri incelendiğinde, Türkiye'nin giderek dışa bağımlı bir ülke haline geldiği görülmektedir. Son on yılda kâğıt hamuru üretimi aynı seviyelerde iken, dış ülkelerden ithal edilen miktar her geçen gün artmaya devam etmiştir

(Tablo 1). Oluklu mukavva sektöründe de Türkiye’de büyük ilerlemeler görülmektedir. Öyle ki, 1993 yılındaki toplam tüketim 371.000 ton iken, 2011 yılında bu tüketim 1,7 milyona kadar yükselmiştir. Bu değerler aynı zamanda, yaklaşık %70 oranında yerli kâğıdın kullandığını gösterir. Oluklu mukavva sektörü Türkiye’de Marmara ve Ege Bölgesi’nde yoğun olarak görülmektedir. Aynı şekilde, bu sektörde Avrupa’da altıncı büyük üretici konumunda olduğundan rekabetçi konumundadır (Atik ve Ok, 2017).



Şekil 2. 2010-2017 yıllarında bazı ülkelere ait kâğıt ve kâğıt hamuru üretim rakamları (FAO, 2017).

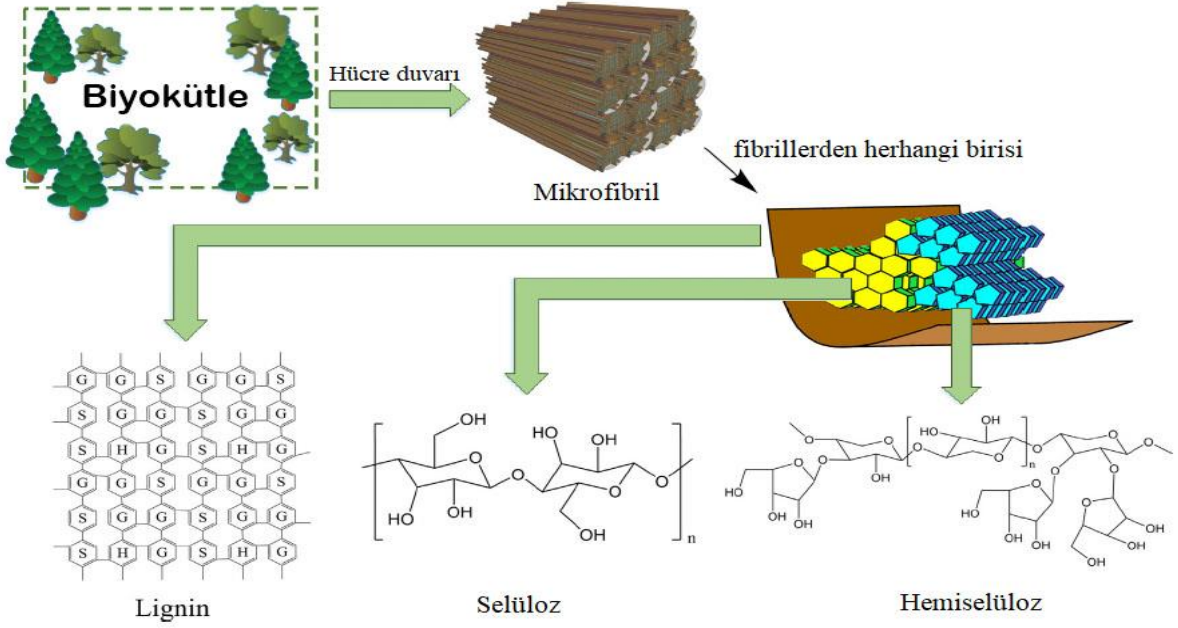
Tablo 1. Türkiye’deki kâğıt, karton ve kâğıt hamuru endüstrisinde ithalat ve ihracatın yıllara göre dağılımı (FAO, 2017).

<b>Kâğıt ve Karton</b>						
<b>Yıllar</b>	<b>Üretim (ton)</b>	<b>İthalat (ton)</b>		<b>İhracat(ton)</b>		<b>Dış Ticaret Açığı (milyon \$)</b>
		<b>Miktar (ton)</b>	<b>Değer (milyon \$)</b>	<b>Miktar (ton)</b>	<b>Değer (milyon \$)</b>	
2010	2.348.000	2.700.004	2.266,37	274.528	234,15	2.032,21
2011	2.659.000	2.613.867	2.500,37	310.817	313,63	2.186,73
2012	2.784.000	2.711.329	2.316,46	362.416	376,23	1.940,22
2013	2.850.000	2.659.151	2.268,62	369.901	433,66	1.834,96
2014	2.900.002	2.696.746	2.279,82	329.707	316,24	1.963,58
2015	2.920.011	2.468.900	1.848,20	475.700	351,10	1.497,10
2016	2.950.010	2.638.300	2.223,18	733.900	637,40	1.585,78
2017	2.930.012	2.672.000	2.345,11	835.000	710,41	1.634,71
<b>Kâğıt Hamuru</b>						
<b>Yıllar</b>	<b>Üretim (ton)</b>	<b>İthalat (ton)</b>		<b>İhracat(ton)</b>		<b>Dış Ticaret Açığı (milyon \$)</b>
		<b>Miktar (ton)</b>	<b>Değer (milyon \$)</b>	<b>Miktar (ton)</b>	<b>Değer (milyon \$)</b>	
2010	118.000	629.200	525,77	1.241	1,45	524,33
2011	128.000	770.140	582,86	2.833	2,74	580,12
2012	116.000	841.000	546,12	1.800	1,98	544,14
2013	118.000	939.728	629,19	31.307	2,22	626,97
2014	123.000	968.813	648,71	38.717	2,72	646,00
2015	109.000	1.032.300	689,08	18.971	1,43	687,65
2016	123.000	1.151.600	668,53	21.180	1,51	667,01
2017	123.000	1.224.230	800,81	17.158	1,29	799,51

Giderek kâğıt ve karton ihraç eden bir ülke olan Türkiye’nin bu konumu, kâğıt imalat endüstrisine verdiği önemin giderek arttığını göstermektedir. Fakat bunun yanında kâğıt geri dönüşümünün düşük olması, kâğıt hamuru hammaddesine duyulan ihtiyacın ve bununla paralel olarak, dış ticaret açığının her geçen yıl artmasına sebebiyet vermektedir. Bu durum da kâğıt maliyetlerin yüksek olmasının nedenlerinden biridir (Tablo 1).

### 1.3. Kâğıt ve Kâğıt Hamurunun Yapısı

Teknik olarak kâğıt; bireysel bitki liflerinden elde edilen ve sonra kurutulan ince keçe (safıha) olarak tanımlanabilir (Atik ve Ok, 2017). Daha derinlere inildikçe, bu bitki liflerini oluşturan ve mikrofibril adı verilen lifsi yapılara rastlamak mümkündür. Bu lifsi yapıları meydana getiren ve bitki biyokütlesinin ana bileşeni olarak kabul gören lignoselüloz, dünya genelinde yenilenebilir, gıda olarak tüketilemeyen ve bitki hücre duvarlarının sentezinde kullanılan yapısal bir maddedir. Bitki hücre duvarları lignoselülozun dışında proteinler, tanenler, organik asitler ve sekonder metabolitler gibi daha küçük yapıli bileşenler de içermektedir. Lignoselüloz; selüloz, hemiselüloz ve lignin olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır ve lignin polimerlerini selüloz ile bağlantılı olan hemiselüloz ile eter veya ester bağları oluşturur (Şekil 3). Bitki biyokütlesi genel olarak; %40-50 oranında selülozdan, %25-30 oranında hemiselülozdan ve %15-20 oranında da ligninden oluşmaktadır. Bununla birlikte yukarıda bahsedilen bağ türlerine, bitki türlerine, varyetelerine ve çevresel koşullara göre bu oranlar değişkenlik göstermektedir. Öyle ki, sert ağaçların kökünde bulunan ksilemler; %40-55 oranında selülozdan, %24-40 oranında hemiselülozdan ve %18-25 oranında da ligninden oluşurken; yumuşak ağaçların köklerinde bulunan ksilemlerde, %45-50 oranında selüloz, %25-35 oranında hemiselüloz ve hemiselüloz ile aynı oranda lignin içermektedir (Chio vd., 2019). Ayrıca, lignoselülozik materyalin içeriği saklama koşullarına, toplama zamanına ve yöntemine göre de değişkenlik göstermektedir.



Şekil 3. Bitki biyokütlelerinde mevcut yapı maddelerinden lignin, hemiselüloz ve selülozun şematik gösterimi.

Alkali hamurdan meydana gelen siyah likörün süspansiyon olarak bulunan katı maddesinde, yaklaşık %65-70 oranında organik madde ve %30-35 oranında inorganik madde bulunmaktadır. Bu yüzdelerde; lignin içeriği yaklaşık olarak %20-30 arasındayken, organik asit içeriği ise yaklaşık %6-10 arasındadır ve toplam sodyum içeriği yaklaşık %20-26 arasındadır (Zhang vd., 2012). Kâğıt hamuru işlemi sırasında, kâğıt hamuru siyah liköründe bulunan polisakkaritler ve ligninler genelde işlenmemiş halde kalır ve bu şekilde siyah liköre müdahale etmek çok daha zor bir hale gelir (Thielemans vd., 2002; Gosselink vd., 2004).

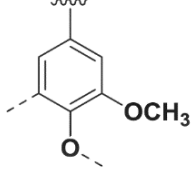
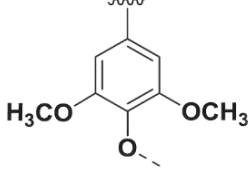
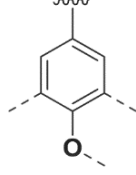
Lignin; vasküler bitki dokularının ana bileşenleri olan, aromatik, karbonhidrat olmayan, zor bozunabilen fenolik bir lignoselüloz bileşenidir. Ağırlık açısından değerlendirildiğinde, yenilenebilir organik maddeler arasında selülozdan sonra gelmekte ve enerji içeriği açısından dünya genelinde en bol miktarda bulunan bir polimerdir (Kirk ve Farrell, 1987). Bu nedenle bu eşsiz biyopolimer, dünyanın karbon döngüsünde merkezi konumdadır. Ligninin etkin bir şekilde degradasyonu, hammadde olarak lignoselülozun kullanılarak ticari açıdan değeri yüksek olan ürünlerin işlendiği endüstriyel sektörlerde büyük önem arz etmektedir (de Gonzalo vd., 2016). Bu biyopolimer bileşen, sadece bitkinin dışarısını saran bir kabuk malzemesi değildir. Ayrıca, patojenlere karşı direnci artırarak

ahşabın mikroorganizmalar tarafından enzimatik hidrolizinin yavaşlatılmasına olanak sağlamakta ve selüloz mikrofibril tabakalarını birbirine kenetleyerek bitki hücre duvarlarını güçlendirir. Hücre duvarlarında bulunan lignin, bitkileri her türlü biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı korur (Weng ve Chapple, 2010; Leisola, Pastinen ve Ax, 2012; Labeeuw vd., 2015; Vavilala vd., 2019).

Moleküler seviyede lignin, fenilpropanoid yolu ile sentezlenen, heterojen halde, çapraz bağlı ve oldukça dağılmış üç farklı alifatik hidroksil grubun karmaşık halde bulunduğu bir fenolik polimerdir. Bu özelliği, alifatik hidroksiller, fenolik hidroksiller ve metoksil hidroksillerin de yer aldığı, üç boyutlu yapısında içerdiği birkaç fonksiyonel gruba dayanmaktadır. Bu içerdiği fonksiyonel gruplar, ligninin reaktivitesini ve kimyasal özelliklerini etkilemektedir. Özellikle hidroksil gruplar ve aromatik yapı, polimerlerin özelliklerini belirlemek için en kritik fonksiyonel gruplardır. Alifatik hidroksil grupları genellikle farklı lignin kaynaklarında en bol bulunan hidroksil grupları olabilmektedir.

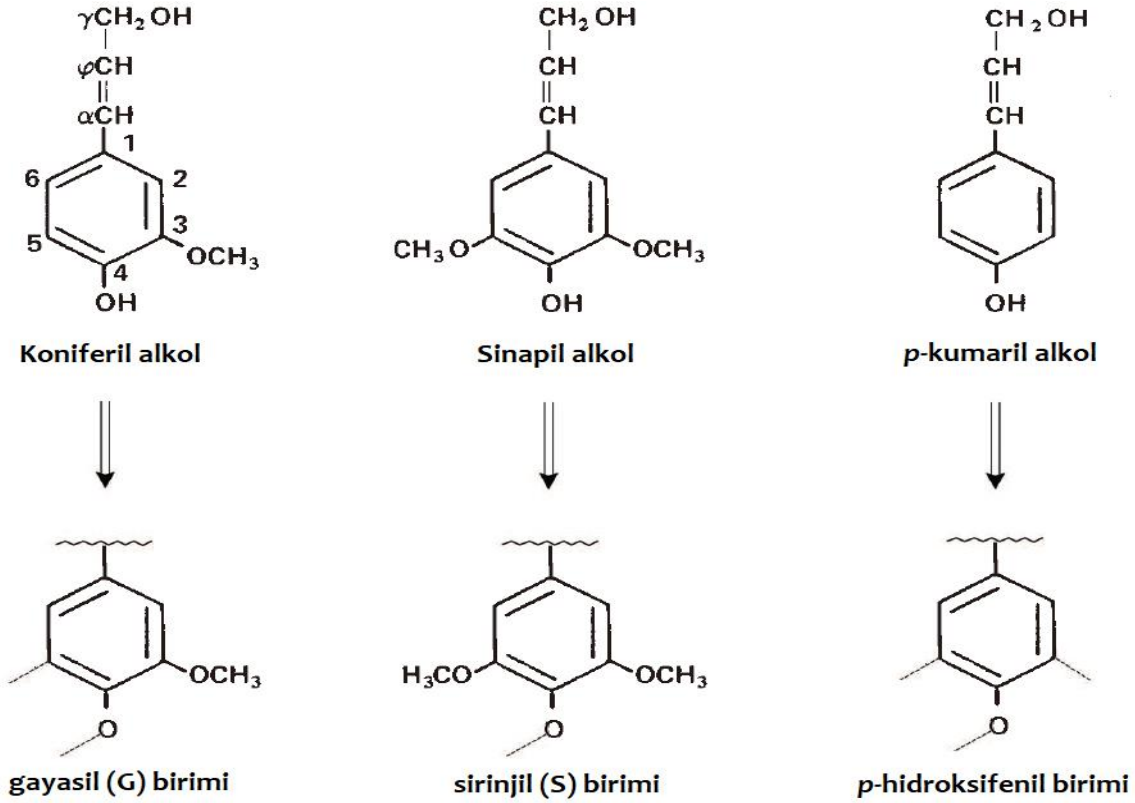
Ligninin yapısında bulunan alifatik hidroksil gruplar monolignol (lignin monomerleri) olarak bilinmektedir. Bu monolignoller, *p*-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkoldür (Terrett ve Dupree, 2019). Lignin makromolekülüne bağlanan bu monolignollerin yapılarında sırasıyla, *p*-hidroksifenil birimi (H), gayasil birimi (G) ve sirinjlil birimi (S) bulunmaktadır ve bu monomerlerin dağılımları, farklı ahşabın veya bitkinin türüne ve dokularına göre değişkenlik göstermektedir (Tablo 2, Schoenherr vd., 2019). Yumuşak ağaçlarda (*Gymnospermler*) G-tipi lignin (%90-95 civarında koniferil alkol içerir), sert ağaçlarda (*Angiospermler*) GS tipi (%25-50 civarında koniferil alkol ve %50-75 civarında sinapil alkol içerir) ve çimenlerde ise GSH ligninlerinin eş molar bir karışımı bulunmaktadır (Şekil 4).

Tablo 2. Lignin birimlerinin basit yapıları ve farklı türlere göre dağılımları.

			
<b>Türler</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>H</b>
Çam (yumuşak ağaç)	%98,3	%0,0	%1,7
Kavak (sert ağaç)	%37,8	%61,9	%0,3
<i>Arabidopsis</i> (dikotil)	%77,1	%20,1	%2,8
Mısır (monokotil)	%38,3	%58,9	%2,8

Bu GSH birimlerinin tümüne birden fenil propan monomerleri adı verilmektedir. Bu birimler, çok miktarda eter karbon–oksijen–karbon (C–O–C) ( $\beta$ -O-4/4',  $\alpha$ -O-4/4',  $\alpha/\gamma$ -O- $\gamma$ , 4-O-5/5', vd.) ve karbon–karbon (C–C) (5–5/5',  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -1,  $\beta$ -5, vd.) olmak üzere, çok çeşitli, karmaşık ve çeşitli bağlarla birbirlerine bağlanmaktadır (Zhou vd., 2011; Liu vd., 2019). Bu bağlar genellikle, aril eter ( $\beta$ -O-4), fenilkumaran ( $\beta$ -5), rezinol ( $\beta$ - $\beta$ ), bifenil eter (4-O-5) ve dibenziodioksin (5–5/ $\beta$ -O-4) bağlarıdır Vavilala vd., 2019). Fenil grupları arasındaki bağı kırmak oldukça zordur ve yüksek miktarda enerji gerektirmektedir, bu açıdan fizikokimyasal metotların yerine biyolojik metotların kullanımı bu yüksek miktardaki enerji gereksinimini ve maliyeti en aza indirmeyi amaçlamaktadır.





Şekil 4. Koniferil, sinapil ve p-kumaril alkollerin aromatik yapıları ve bulundukları birimlerin şematik gösterimi.

#### 1.4. Kâğıt ve Kâğıt Hamurunun Degredasyonunda Görev Alan Enzimler

Moleküler biyoloji alanında yapılan ilk keşifler ve biyoloji mühendisliği disiplininde katedilen ilerlemeler, bu mikroorganizmaların metabolik ağlarında yapılan rasyonel manipülasyonlarla bazı zorluklara bir çözüm sunmaktaydı. Rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkmasıyla, biyoremediasyonun saha içindeki uygulamalarından, genetik mühendisliği uygulamalarına dönüştürülmesi sağlandı. Bu yeni alanın amacı; tüm organizmaları incelemek, bu organizmaların kullandığı biyodegradasyon yollarını araştırmak ve hedef alınan kirleticilerin bulunduğu ortamda mineralizasyonunu sağlayan enzimleri tespit etmek, bunları üretmek ve karakterizasyonlarını gerçekleştirmektir (Dvořák vd., 2017). Lignin degradasyonunda genellikle funguslar veya bakterilerin içinde bulunduğu birçok organizma türü görev almaktadır. Funguslar arasında en yaygın lignin degredicileri beyaz küf fungusları,

filamentöz funguslar ve maya taksonları iken, bakterilerde genellikle *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* şubesine mensup türler lignin degredicileri olarak bilinmektedir (Bugg vd., 2011; Tian vd., 2014; Brink vd., 2019). Bu organizmalar içinde yalnızca birkaç grubu karmaşık yapıya sahip fenolik lignin polimerini degrede edebilme kabiliyetine sahiptir. 1980'li yıllara uzanan araştırmalara dayanılarak, lignin degradesyonu için funguslar, nispeten güçlü enzim sistemlerine sahiptir. Bu nedenle kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde bu organizmalardan faydalanılmaktadır. Fungusların yanında bakteri türlerinin birçoğunun ve bunların sentezledikleri enzimlerin lignini degrede ettiği, rengini ağarttığı ve kirleticinin toksisitesini düşürmesi ile ilgili yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Chandra vd., 2007).

Fungusların lignini ayrıştırabilme kabiliyetleri, yıllardan beri çalışılmış ve hatta günümüzde de çalışılmaya devam ediliyor olsada, fungusların sıkı büyüme koşulları ve müşkülpesentliği, oksijen sınırlamaları ve düşük oksijen konsantrasyonlarının funguslar üzerinde bir inhibitör etkisi yaratmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte fungusların pH değişimlerine karşı adaptasyondaki zayıflıklar, sıcaklık ve sporlar tarafından kolay kirlenmeleri, enzimleri lignin degradesyonu için çok iyi aktivite göstermesine rağmen karmaşık yapılarından ötürü manipülasyonlarındaki zorluklar gibi birçok kusurları bulunmaktadır (Wang vd., 2013). Funguslar, ekstrem çevre şartlarında da bakteriler kadar kararlı değildir. Oysa, kâğıt ve kâğıt hamurundan elde edilen siyah likör alkali pH'a sahip bir atık sudur. Bu olumsuzluklar bütünüyle ele alındığında, fungusların kâğıt ve kâğıt hamuru endüstriyel alanlarında kullanımları bir geri plana atılmaktadır.

Funguslarla karşılaştırıldığında bakteriler daha geniş pH, sıcaklık ve oksijen aralıklarını tolere edebilmekte ve enzim yapılarının basitliğinden ötürü manipülasyonları daha kolay olabilmektedir. Aynı zamanda, bakteriler anaerobik koşullara muazzam bir adaptasyon sergilemekte, sıcaklık, pH ve oksijen sınırlamalarına karşı oldukça toleranslı olabilmektedir (Wu ve He, 2013). Bu açılardan ele alındığında, bakterilerin günümüzde özellikle çok cazip bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Bakteriler içinde şimdiye kadar, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus jostii*, *Rhodococcus opacus*, *Acinetobacter baylyi*, *Serratia marcescens*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Xanthomonas*, *Arthrobacter*, *Amycolatopsis* gibi birçok mikroorganizmanın lignoselüloz ve türevlerini degrede edebilme kabiliyetine sahip oldukları tespit edilmiştir (Zimmermann, 1990; Zhu vd., 2017; Janusz vd., 2017; Brink vd.,

2019). Bunların yanında;  $\alpha$ -*Proteobacteria* sınıfında bulunan *Brucella*, *Ochrobactrum*, *Sphingobium* ve *Sphingomonas* türleri; ayrıca,  $\gamma$ -*Proteobacteria* sınıfına ait olan *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter lignolyticus* ve *Escherichia coli* gibi birçok türün lignolitik olduğuna dair birçok araştırma konusu bulunmaktadır (Kalyani vd., 2011; Bugg vd., 2016; Liu vd., 2019). Burada bahsi geçen türler dışında, günümüzde yeni bakteri türleri keşfedilmekte ve bunun kâğıt ve kâğıt hamuru atık suyuna müdahale üzerine potansiyelleri açıklanmaya çalışılmaktadır. Mesela yapılan bir araştırmada, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstriyel siltlerinden izole edilen 10'dan fazla lignin degrede edici bakteri tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda bu bakterilerin *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Aneurinibacillus* ve *Bacillus* cinslerine ait türlerin olduğu anlaşılmıştır (Chandra vd., 2007).

Enzimler, bütün canlılarda kimyasal reaksiyonları yönlendiren katalizörler olarak bilinmektedir. Ortamda az miktarda bulunmaları veya bazılarının birden fazla reaksiyona katılabilme yeteneklerinin bulunması, girdikleri reaksiyondan değişmeden çıkabilmeleri, fizikokimyasal yöntemlerde meydana gelen enerji açlığını aza indirerek girdikleri sürecin hızını arttırmaları, sadece belli reaksiyonlara özgül olmaları ve belirli sıcaklık ve pH aralığında aktif olmaları gibi çok çeşitli özelliklere sahiplerdir. Bu katalizörlerin endüstriyel süreçlerde görev almaya başlamaları, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinin en büyük pazar ihtiyacına sahip sektörlerden biri haline gelmelerine ön ayak teşkil etmiştir. Kişi başına düşen kâğıt ihtiyacının özellikle gelişmiş ülkelerde giderek artması, bu endüstrinin getirisi olan kirleticilere müdahalede çevre dostu çalışmaların ve etkili üretim sürecinin önem kazanmasını sağlamaktadır.

Lignin degradasyonundan sorumlu enzimler için ligninazlar, lignolitik enzimler gibi birçok terim tercih edilmektedir ve bu sürece katılan enzimler iki ana grupta incelenmektedir. Bunlar lignini modifiye edici enzimler ve lignin degradasyonuna yardımcı enzimlerdir. Lignin modifiye enzimler grubuna yapılarında bakır bulunduran fenol oksidazlar (lakkazlar) ve lignin, mangan ve çok fonksiyonel (versatil) peroksidazları içine alan ve yapısında hem grubu içeren peroksidazlar girmektedir (Tian vd., 2014; Janusz vd., 2017). İkinci gruptaki enzimler ise, lignini kendi başlarına degrede edemezler, ancak degradasyon sürecinde olmazsa olmaz enzimlerdir. Bu enzimler grubunda; aril alkol oksidazlar, aril alkol dehidrojenazlar, glioksal oksidazlar, kinon redüktazlar, sellobiyoz dehidrojenazlar, süperoksit dismutazlar, glukoz 1-

oksidazlar, piranoz 2-oksidazlar ve metanol oksidazlar yer almaktadır (J da Silva Coelho-Moreira, 2013).

### 1.5. Peroksidazlar

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), en yaygın, neredeyse her organizmada mevcut ve yapılarında hem grubu bulunan bir glikoproteindir. Yapılarında demir (III) protoporfirin-9 prostetik grubunu taşırlar. Yaklaşık olarak, 30 ila 150 kDa arasında değişen bir moleküler ağırlığa sahiptirler. Bunlar, hemen hemen bütün organizmalarda hidrojen peroksit gibi peroksitleri elektron alıcısı olarak kullanarak, çeşitli organik ve inorganik bileşiklerin oksidasyonunu katalize eden bir oksidoredüktaz grubudur. Enzim kaynağı, taşıdığı izoenzimi ve hidrojen vericisi göz önüne alındığında, pH 4 ila 7 arasında en iyi aktiviteyi göstermektedir.

Peroksidazların katalitik döngüsü, farklı enzim araformlarını içermektedir. İlk olarak,  $Fe^{4+} = O$ -porfirin  $\pi$ -kasyon radikalinin bir hem yapısına sahip olan ve bileşik I (CoI) olarak adlandırılan dengesiz bir araform oluşturmak üzere hidrojen peroksit ile oksitlenir ve bunun sonucunda peroksit suya indirgenir. Sonra CoI, bileşik II (CoII) 'ye elektron vermek üzere elektron vericisi substratı oksitleyerek serbest bir radikali açığa çıkartır. Ayrıca CoII, ikinci substrat molekülü tarafından indirgenerek, demirin  $Fe^{3+}$  formunu yeniden kazandırmak için başka bir serbest radikal üretir (Hamid ve Rehman, 2009).

Peroksidazlar;

- Fenolik kirleticilerin ve bu kirleticilerin türevi olan bileşenlerin uzaklaştırılması
- Sentetik boyaların renginin ağartılması
- Organik bileşiklerin ve polimerlerin sentezi
- Domuz gübresinin kokusunun giderilmesi
- Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisindeki uygulamaları
- Peroksidaz biyosensörleri
- Analiz ve teşhis kitleri uygulamaları
- Enzim immünoassayleri (ELISA)
- Biyoyakıt üretiminde fungal peroksidazların yeni geliştirilen stratejileri gibi çok yaygın kullanım alanlarına sahiptir (Hamid ve Rehman, 2009).

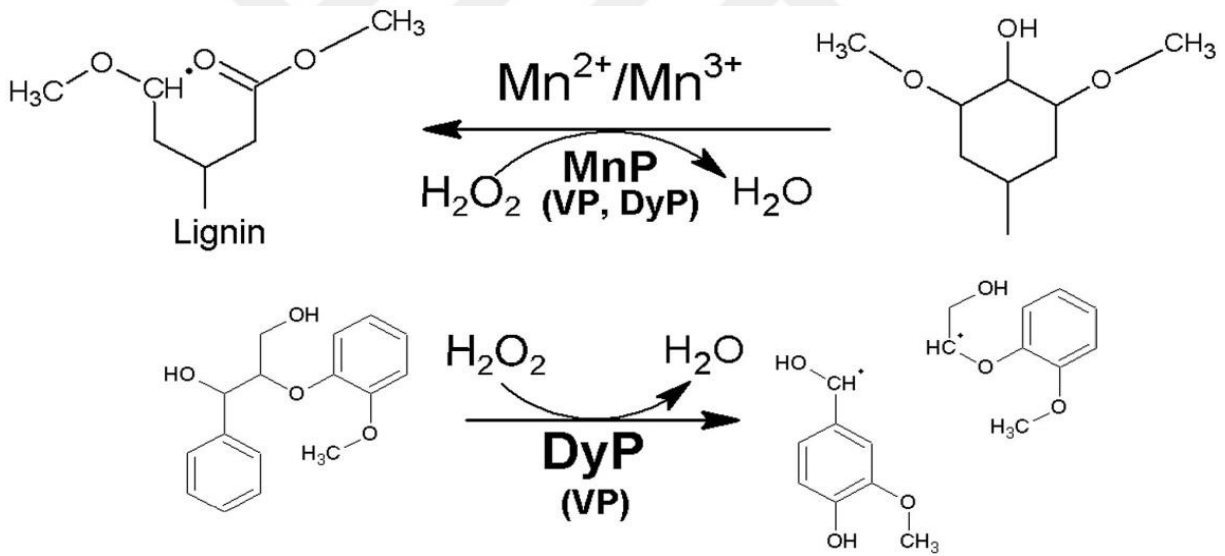
RedoxiBase (<http://peroxibase.toulouse.infra.fr/>) veritabanına göre peroksidazlar, katalazlar, haloperoksidazlar, di-hem sitokrom c peroksidazlar, hayvan peroksidazları ve hayvanlarda bulunmayan peroksidazlar (daha önceleri bu enzim grubu bitki peroksidazları (Welinder, 1992; Zámocký vd., 2014) olarak adlandırılmaktaydı) ve DyP-tipi (boya ağartıcı) peroksidazlar olmak üzere altı sınıfta değerlendirilmektedir. Hayvanlarda bulunmayan peroksidazlar, kendi aralarında ayrıca sınıf I, II ve III olmak üzere üç sınıfta değerlendirilmektedir. Sınıf I peroksidazlar, katalaz-peroksidazları, prokaryotlardaki hücre içi ve ökaryotlarda organellerde bulunan ökaryotik hem peroksidazları (örn: mitokondriyal); sınıf II tüm hücre dışı ökaryotik enzimleri ve günümüzde prokaryotlarda da olduğu bilinen lignin peroksidazlar (LiP), mangan peroksidazlar (MnP) ve versatil peroksidazları (VP) içermektedir. Sınıf III peroksidazlar ise, tüm salınan bitki hem peroksidazları içermektedir (Sugawara vd., 2017; Janusz vd., 2017).

Prokaryotlarda en sık saptanan ve çalışılan lignolitik enzimlerden biri hiç şüphesiz bakır içeren lakkazlardır. Lakkazlar dışında en çok bilinenleri ise, hiç şüphesiz yukarıda belirtildiği gibi lignin peroksidazlar (LiP; EC 1.11.1.14), mangan peroksidazlar (MnP; EC 1.11.1.13), versatil peroksidazlar (VP; EC 1.11.1.16) gibi enzim ailesini barındıran, sınıf II hayvanlarda bulunmayan peroksidazlardaki hem peroksidazlar grubudur. Klasik peroksidaz sınıflandırmasından ziyade LiP, MnP ve VP enzimleriyle filogenetik açıdan ilişkisi bulunmayan ve günümüzde yeni bir peroksidaz türü olarak bilinen DyP-tipi (boya ağartıcı) peroksidazlar hakkında da birçok çalışma bulunmaktadır.

DyP-tipi peroksidazlar (EC.1.11.1.19), daha 21. yüzyılın başlarında yeni yeni ortaya çıkan bir terimdir. Bu içinde bulunduğumuz yüzyılda giderek gelişen genomik ve proteomik analizler sayesinde, daha önceleri mangan peroksidaz, versatil peroksidaz gibi bilinen peroksidazlarla ilişkisi bulunmayan, hem peroksidaz ailesine mensup bir enzimdir (Knop vd., 2016). DyP-tipi peroksidazlar, RedoxiBase veritabanına göre filogenetik açıdan A, B, C ve D olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır. Bunlardan A sınıfı; Tat sinyal dizisini taşıyan hücre dışı enzimleri, B ve C sınıfı ise sitoplazmik enzimleri ifade etmektedir. Birçok potansiyel bakteriyel kökenli enzimler B ve C sınıfında bulunmaktadır. D sınıfı ise fungal kökenli enzimlerdir.

DyP-tipi peroksidazlar diğer hem peroksidazlarla karşılaştırıldığında, daha basit bir yapıya sahiptir. Yapılarında  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -paralel tabakaları içeren iki domain bulunmaktadır

ve bu domainler arasına hem kofaktörü yerleşmektedir. Lignin degradasyonu için bu enzimler, boyaları, lignin ve ligninle ilişkili olmayan bileşikleri aril eter ( $\beta$ -O-4) bağlarını kopararak okside etmektedir. Ayrıca, mangan peroksidaz ve versatil peroksidazın bir özelliği olan  $Mn^{2+}$ 'yi de okside edebilirler. (Şekil 5; Colpa vd., 2014; Janusz vd., 2017). Bu enzimler, düşük pH aralıklarında çalışabilme kapasitesine sahiptirler. Bu enzimlerin moleküler ağırlıkları genellikle 50 ila 60 kDa aralığındadır. Fakat bazı bakterilerde daha küçük boyuta sahiptirler (yaklaşık 40 kDa). Bilinen peroksidazlardan bir üstünlükleri de DyP-tipi peroksidazların hidrolaz ve oksijenaz aktivitelerine sahip olmalarıdır (Sugano vd., 2009). DyP-tipi peroksidazlar düşük özgülük gösterirler ve tüm peroksidaz substratlarını okside edebilirler.



Şekil 5. DyP-tipi peroksidazların katalitik döngüsü. Parantez içinde belirtilen enzimler de şekildeki katabolik reaksiyonları gerçekleştirebilme yeteneğine sahiptir. (MnP; mangan peroksidaz, VP; versatil peroksidaz, DyP; DyP-tipi peroksidaz) (Janusz vd., 2017).

DyP-tipi peroksidazlar ilk kez bir fungus türü olan *Bjerkandera adusta* (önceden *Geotrichum candidum* Dec 1)'da tespit edilmiştir (Kim ve Shoda, 1999). En son yapılan genomik araştırmalarla birlikte bu enzimler genellikle bakterilerde, az sayıda funguslarda ve yüksek yapılı ökaryotlarda bulunmaktadır (Janusz vd., 2019). *Thermobifida fusca* ve

*Rhodococcus jostii* gibi birçok bakteri türünde de yaygın oldukları yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. (Tablo 3). Bu tür çalışmaların laboratuvarında gerçekleştirilebileceği kanıtlanmıştır ve bir sonraki aşama olan endüstriyel seviyelere yükseltilebileceği öngörülmektedir.

Tablo 3. Bazı bakterilerden karakterize edilen DyP-tipi peroksidazların gösterimi (Colpa vd., 2014).

Alt familya	Proteinin adı	Elde edildiği organizma	Referans
A	EfeB/YcdB	<i>Escherichia coli</i> O157	Liu vd., 2011
	DyPA	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Ahmad vd., 2011
	TfuDyP	<i>Thermobifida fusca</i>	van Bloois vd., 2010
	BsDyP (YwbN)	<i>Bacillus subtilis</i>	Jongbloed vd., 2004 Santos vd., 2013
B	DyPB	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Ahmad vd., 2011; Roberts vd., 2011
	TyrA	<i>Shewanella oneidensis</i>	Zubieta vd., 2007a
	BtDyP	<i>Bacteriodes thetaiotaomicron</i>	Zubieta vd., 2007b
	PpDyP	<i>Pseudomonas putida</i>	Sezer vd., 2013
	DyPPa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PKE117	Li vd., 2011
C	-	-	-
D	-	-	-
Sınıfı belirsiz	BLDyP	<i>Brevibacterium linens</i> M18	
	EfeX*	<i>Escherichia coli</i> O157	
	Dyp1B	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	Rahmanpour vd., 2015
	DyPT1	<i>Rhodococcus</i> sp. T1	Sahinkaya vd., 2018
	CboDyP	<i>Cellulomonas bogoriensis</i>	Habib vd., 2019
	RaoPrx	<i>Raoultella ornithinolytica</i> OKOH-1	Falade vd., 2019
	PmDyP	<i>Pseudomonas</i> sp. Q18	Yang vd., 2018

\*Potansiyel olarak B sınıfına mensup

## 1.6. Çalışmanın Amacı

Organizmaların kâğıt ve kâğıt hamuru atık suyunda biyoremediasyon denemelerine dair yapılan araştırma sayısı her geçen gün artmaktadır. Araştırmalar genelde funguslar üzerinde yoğunlaşmıştır. Fakat fungusların sınırlı oksijene ve yüksek pH'lara karşı dayanıksız olmaları, manipülasyon zorlukları ve ekstrem çevre koşullarında yararlı olamamaları gibi sıkıntılar araştırmacıların ilgisini bakterilere yöneltmiştir. Ek olarak, literatürlerde lignin degradasyonu çalışmaları funguslara kıyasla daha azdır. Buna rağmen, bakteriler değişen ortamlara karşı olağanüstü bir adaptasyon yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, lignolitik bakteriler, endüstriyel lignin kullanımı için bir buluş niteliği taşımaktadır. Ayrıca, bu mekanizmaları nasıl gerçekleştirdiklerine dair giderek artan bu merak, ilgileri enzim seviyesine çevirmiştir. Birçok araştırmada, lignin degrade edebilen bakteri suşları ileri moleküler yöntemlerle keşfedilmiştir, ancak yeni uygulanabilir suşlar için araştırmalara ihtiyaç gerekmektedir.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında; kızılçam kâğıt ve kâğıt hamuru siyah likörü üzerinde *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus megaterium* bakterilerinin lignin degradasyon yetenekleri test edilmiştir. Bu bakterilerle kâğıt ve kâğıt hamuru atık sularının çevre ve organizmalar üzerindeki toksik etkilerinin giderilmesi öngörülmüştür. Ayrıca, moleküler seviyedeki çalışmalarla DyP-tipi peroksidaz enziminin varlığı aydınlatılmaya çalışılmıştır.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Kimyasallar

Protein markörü (New England BioLabs®, P7710S), Biotinlenmiş 2-Log DNA markörü (0.1-10 kb) (New England BioLabs®, N7554), Tripton (Merck, V441613949), Maya ekstraktı (Merck VM175053), Agar (Sigma, 05039), Alkali kraft lignin (Sigma, 370959), Bakteriyolojik pepton (Oxoid, LP0037), Sodyum klorür (Sigma, S3014), MgSO<sub>4</sub> (Sigma, 208094), D-(+)-glukoz (Sigma, G8270), D-(-)-Fruktoz (Sigma, F0127), Gliserol (Merck, K40789992008), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, A678671), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 567300), Bromofenol mavisi (Gerbu, 080702), TEMED (Amresco, 0761), NaOH (Sigma, 06203), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, 1.00731.500), N,N'-Metilenbisakrilamid, %99 (Roth, 112171975), *o*-Dianisidin (Sigma, D9143), APS (Merck, 101200), Etil alkol (Sigma, 24102), Sodyum bifosfat (Merck, 1065861000), Coomassie Brilliant Mavisi G-250 (Sigma, B0770), Coomassie Brilliant Mavisi R-250 (Merck, 2C2133453), BSA (Promega, R396), Glisin (Sigma, G8898), Potasyum heksakloroplatinat (Sigma, 206067), Ampisilin (Fischer Scientific, BP1760), Agaroz (Gibco, 5517UB), Wizard® Genomik DNA Saflaştırma Kiti (Promega, A1125), pGEM®-T Easy Klonlama Kiti (Promega, A1360), PureLink™ Quick Jelden Çıkartma Kiti (Invitrogen, K210012) Trizma bazı (Fischer Scientific, BP152), Sükroz (Merck, K46376951527), Kalsiyum klorür dihidrat (Sigma, 12022) kullanıldı.

### 2.2. Kullanılan Mikroorganizmalar

KTÜ, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ABD Araştırma Laboratuvarı'nın envanterinde mevcut olan *Bacillus megaterium* ve *Bacillus licheniformis* bakterileri kullanıldı.

### 2.3. Araştırma Materyali

Tez çalışmasında araştırma materyali olarak kullanılan, kızılçam kâğıt hamurundan elde edilen siyah likör, OYKA Kâğıt Ambalaj firmasına ait olup, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği'nden temin edilmiştir.

## 2.4. Optimizasyon Çalışmaları

### 2.4.1. Kullanılan Besiyerleri

Optimizasyon çalışmalarında MSM besiyeri (g/L: 2,4: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,01: MgSO<sub>4</sub>, 0,01: CaCl<sub>2</sub>, 5: pepton, 1 mL/L trace element solüsyonu (g/L: 1,5: nitriloasetik asit, 3: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5: MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1: NaCl, 1: FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1: CoSO<sub>4</sub>, 0,1: CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,1: ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01: CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,01: AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O, 0,01: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,01: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O); pH 7,6) kullanıldı.

CFU analizleri için LB (Luria-Bertani) (g/L: 10: tripton, 5: pepton, 5: NaCl; pH 7,0) sıvı besiyeri ve LB agar besiyeri kullanıldı (Luria, 1984).

Lignin degradasyonun zon oluşumunu gözlemlemek için; LBM agar besiyeri (g/L: 1: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5: C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 0,001: CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,5: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001: Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 0,01: maya ekstraktı, 0,01: CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,001: MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 16: agar; pH 7,0) hazırlandı.

### 2.4.2. Siyah Likörün Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bakterilerin çoğaltılacağı optimum siyah likör konsantrasyonunun belirlenebilmesi için %5 (v/v) ve %10 (v/v) oranında siyah likör içeren MSM kullanıldı. İki farklı oranda siyah likör içeren MSM besiyerine, 600 nm'deki optik yoğunluğu (OD<sub>600</sub>), 0,15 olacak şekilde *B. licheniformis* ve *B. megaterium* bakterileri inoküle edildi. Numuneler 37°C'de ve 140 rpm'de 144 saat boyunca inkübe edildi. Söz konusu numunelerden her gün örnek alınarak en iyi rengin ağardığı oranı belirlemek için analizler yapıldı. Alınan örnekler 8000xg'de 30 dk. santrifüj edildi. Ardından 100 kat sulandırılmış 1 mL süpernatant, 3 mL fosfat tamponu (0,1 M pH: 7,6) ile karıştırıldı ve 280 nm'de ölçümleri yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerine göre optimum siyah likör konsantrasyonu belirlendi (Verma ve Ekka, 2018).

### 2.4.3. CFU Analizleri

Karbon ve azot kaynağı optimizasyon çalışmaları boyunca bakterilerin SL içeriğindeki canlı hücre miktarını belirlemek için CFU analizleri yapıldı. Karbon ve azot

kaynaklarıyla beraber bunların optimum konsantrasyonlarını belirlemek için yapılan optimizasyon çalışmaları boyunca örnekler toplandı.

Öncelikle steril kabin içerisinde 96 kuyulu steril planelere 1.kuyudan itibaren 10. kuyuya kadar 90 µl LB sıvı besiyeri konuldu. Ardından toplanan örneklerden 10 µl alınarak 1.kuyudaki LB sıvı besiyeri ile karıştırıldı. Böylece  $10^{-1}$ 'den ve  $10^{-10}$ 'a kadar seri dilüsyon hazırlandı. Her bir dilüsyondan LB agar petrisine 10 µl ekim yapıldı. Petripler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra oluşan koloniler sayıldı.

#### 2.4.4. Karbon Kaynağının Belirlenmesi

Siyah likördeki (SL) lignin degradasyonu çalışmaları için 100 mL'lik erlenler kullanıldı. Siyah likörün renk ve lignin içeriğini azaltmak için bakterilerin çoğaltılacağı MSM besiyerine eklenecek karbon kaynakları olarak; glukoz, galaktoz, fruktoz, sükroz ve sodyum asetat belirlendi. Başlangıç konsantrasyonu olarak %1 (w/v) belirlendi ve bu konsantrasyonda beş farklı %5 (v/v) SL-MSM besiyeri (pH 7,6) hazırlandı (Tablo 4).

100 mL'lik erlenlere toplam hacmi 30 mL olacak şekilde besiyeri ilave edildi. Başlangıç  $\text{OD}_{600} = 0,15$  olacak şekilde besiyerine bakteri inokülasyonu yapıldı.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de ve 140 rpm'de, 144 saat süreyle inkübe edildi. Her gün bu besiyerlerinden örnekler alındı. Toplanan siyah likörlü besiyeri örnekleri 8000 xg'de 30 dk. santrifüj edildi ve spektrofotometre yardımıyla 280 nm'de absorbanları ölçüldü.

Tablo 4. Karbon kaynağını belirlemek için hazırlanan besiyerleri.

Negatif kontrol	%5 (v/v) SL-MSM (%1 glukoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 galaktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 sodyum asetat, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 sükröz, pH 7,6)
<i>B. licheniformis</i>	%5 (v/v) SL-MSM (%1 glukoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 galaktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 sodyum asetat, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 sükröz, pH 7,6)
<i>B. megaterium</i>	%5 (v/v) SL-MSM (%1 glukoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 galaktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 sodyum asetat, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 sükröz, pH 7,6)

Optimizasyon çalışmaları sonucunda en iyi renk gidermesinin tespit edildiği karbon kaynağı belirlendikten sonra, optimum konsantrasyonunu tayin etmek için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla; sırasıyla %0,25; %0,50, %1; %1,5 ve %2 (w/v) konsantrasyonlarında, en iyi renk gideriminin tespit edildiği karbon kaynağı eklenerek beş farklı MSM besiyeri hazırlandı (Tablo 5). Yine 100 mL'lik erlenlere 30 mL %5 (v/v) SL'li besiyeri ilave edildi ve bakteri inokülasyonu yapıldı. 144 saat süreyle inkübe edildi ve her gün örneklerden numuneler alınarak analiz edildi. Tespit edilen sonuçlara göre en iyi ağarmanın görüldüğü karbon kaynağı seçildi ve azot kaynağı optimizasyon çalışmalarına geçildi.

Tablo 5. Karbon kaynağının konsantrasyonunu belirlemek için hazırlanan besiyerleri.

Negatif kontrol	%5 (v/v) SL-MSM (%0,25 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%0,50 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1,5 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%2 fruktoz, pH 7,6)
<i>B. licheniformis</i>	%5 (v/v) SL-MSM (%0,25 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%0,50 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1,5 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%2 fruktoz, pH 7,6)
<i>B. megaterium</i>	%5 (v/v) SL-MSM (%0,25 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%0,50 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1,5 fruktoz, pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%2 fruktoz, pH 7,6)

#### 2.4.5. Azot Kaynağının Belirlenmesi

En iyi renk gideriminin tayin edildiği karbon kaynağı ve optimum konsantrasyonu belirlendikten sonra azot kaynağı optimizasyon çalışmalarına geçildi. MSM besiyerine eklenecek azot kaynakları olarak; tripton, maya ekstraktı, sodyum nitrat ve pepton belirlendi. Bu kaynaklar ayrı ayrı %1 (w/v) konsantrasyonda ilave edilerek, dört farklı ve %1 (v/v) fruktozlu %5 SL-MSM besiyeri (pH 7,6) hazırlandı (Tablo 6).

Tablo 6. Azot kaynağını belirlemek için hazırlanan besiyerleri.

Negatif kontrol	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 sodyum nitrat; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 tripton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1 maya ekstraktı; pH 7,6)
<i>B. licheniformis</i>	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 sodyum nitrat; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 tripton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1 maya ekstraktı; pH 7,6)
<i>B. megaterium</i>	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 sodyum nitrat; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (% 1 fruktoz, % 1 tripton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1 maya ekstraktı; pH 7,6)

100 mL'lik erlenlere, 30 mL %1 fruktozlu besiyeri ilave edildi. Başlangıç  $OD_{600} = 0,15$  olacak şekilde besiyerine bakteriler inoküle edildi.  $37^{\circ}C$ 'de ve 140 rpm'de, 144 saat süreyle çoğaltıldı. Her gün bu besiyerlerinden örnekler alındı. Toplanan siyah likörlü besiyeri örnekleri aynı gün içinde spektrofotometre yardımıyla 280 nm'de absorbansları ölçüldü.

280 nm'de ölçülen absorbans verilerine dayanarak MSM besiyeri içeriğine eklenecek azot kaynağı belirlendi. Bunun üzerine sırasıyla %0,25; %0,50, %1; %1,5 ve %2 (w/v) konsantrasyonlarında, en iyi renk gideriminin tespit edildiği azot kaynağı eklenerek, %1 (v/v) fruktozlu %5 SL-MSM besiyeri hazırlandı (Tablo 7). 100 mL'lik erlenlere, 30 mL %1 fruktozlu besiyeri ilave edildi ve bakteri inokülasyonu yapıldı.  $37^{\circ}C$ 'de ve 144 saat süreyle inkübe edildi ve her gün örneklerden numuneler alınarak analizleri yapıldı.

Tablo 7. Azot kaynağının konsantrasyonunu belirlemek için hazırlanan besiyerleri.

Negatif kontrol	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %0,25 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %0,50 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1,5 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %2 pepton; pH 7,6)
<i>B. licheniformis</i>	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %0,25 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %0,50 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1,5 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %2 pepton; pH 7,6)
<i>B. megaterium</i>	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %0,25 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %0,50 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %1,5 pepton; pH 7,6)
	%5 (v/v) SL-MSM (%1 fruktoz, %2 pepton; pH 7,6)

#### 2.4.6. Renk Tayini

Lignin degradasyon çalışmaları sırasında elde edilen bakteri süpernatantları ile gerçekleştirilen renk ağarması deneyleri APHA'nın belirlediği standartlara göre belirlendi (APHA, 2011; Yadav ve Chandra, 2017). Besiyerlerindeki mevcut lignin içeriği için, 8000 xg'de 30 dk. boyunca çöktürülen örneklerin süpernatantları (1 mL) alınarak, 3 mL fosfat tamponu (pH 7,6) ile seyreltikten sonra 280 nm'de absorbansları ölçüldü.

#### 2.4.7. Lignin Degradasyon Oranının Belirlenmesi

Pearl ve Benson (1940) tarafından keşfedilen ve Barnes vd. (1943) tarafından geliştirilen bu yöntem, herhangi bir solüsyonun içerisindeki lignin içeriğini belirlemek için nitrozleme adı verilen belirli bir kimyasal reaksiyona dayanır.

Lignin içeriğini belirlemek için öncelikle örnekler nötr veya bazik pH'a ayarlandı. Daha sonra 50 mL'lik numuneye, 1 mL %10'luk asetik asit çözeltisi ve ardından 1 mL %10'luk sodyum nitrit çözeltisi ile karıştırıldı. 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Sürenin sonunda, bu örneğin içerisine 2 ml 2N'lik amonyum hidroksit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve 5 dk. sonra örneklerin 430 nm'de absorbansları ölçüldü. Körlemek için, 50 mL distile suyun içerisine 1 mL %10'luk asetik asit çözeltisi ve içerisine 2 mL 2N'lik

amonyum hidroksit çözeltisi eklendi. 15 dk. sonrasında ise 1 mL %10'luk sodyum nitrit çözeltisi ile karıştırıldı. Ölçülen absorbans değerlerinden lignin içeriğini hesaplamak için;

$$\text{Lignin (ppm)} = \text{Abs.}/0,000247$$

formülü kullanıldı. "0,000247" değeri tatlı su örneklerindeki lignin içeriğini belirlemek için kullanılan sabittir (1000 ppm = 1 mg/mL).

#### 2.4.8. Lignin Degredasyon Zonunun Gözlenmesi

Bakterilerin lignin degradasyonu bakımından pozitif olduklarını petride gözlemek için LBM agar besiyeri hazırlandı. Besiyerinin yarısına %0,00025 metilen mavisi (0,00025 g/L), diğer yarısına ise %0,25 oranında kraft lignin (2,5 g/L) ilave edildi. %0,005 KL içeren MSM (pH 7,2) besiyerine inoküle edilen bakteri örnekleri bir gece boyu çoğaltıldı. Ertesi gün bu bakterilerden alınan örnekler 8000 xg'de 30 dk. santrifüj edildi. Santrifüj esnasında metilen mavisi ve kraft lignin içeren LBM agarlı petrilere kuyucuklar açıldı. Ardından çöktürülen numunelerin süpernatantlarından 100'er µL alınarak kuyucukların içerisine eklendi. Petrideki agarın süpernatant sıvısını tamamen nüfuz etmesi beklendi. Petriler 37°C'de bekletildi. Ertesi gün oluşan zonlar incelendi.

#### 2.4.9. Proteinlerin Elde Edilmesi

Bakterilerden protein elde etmek için, MSM besiyeri ve %0,75 (w/v) oranında kraft lignin (KL) içeren MSM besiyeri (pH 7,6) olmak üzere iki farklı besiyeri hazırlandı. Daha sonra bakteriler 37°C'de ve 140 rpm'de 16 saat çoğaltıldı. Ertesi gün OD<sub>600</sub> değerleri ölçüldü. Bu değerlerden yola çıkılarak; 500 mL'lik erlenlere, hacimce 1/10 oranında hem MSM (pH 7,6) hem de %0,75 (w/v) kraft lignin içeren MSM besiyeri konuldu (her bir bakteri için). Başlangıç kültürü için OD<sub>600</sub> = 0,15 olacak şekilde bakteri inokülasyonu yapıldı. Bunlara ilaveten; negatif kontrol (bakteri içermeyen) olacak şekilde aynı hacimde iki besiyeri daha hazırlandı. Toplamda altı erlen, 37°C'de ve 140 rpm'de 144 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 2. günden itibaren bakteri içeren besiyerlerinden örnekler toplandı. Bu örnekler toplandıktan sonra aynı gün içerisinde 8.000 rpm'de 30 dk. santrifüj edildi. Ardından süpernatant pelletinden ayrıldı ve -20°C'de saklandı.

Daha sonra süpernatantı uzaklaştırılan pellet örnekleri 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,6) ile çözüldü ve örnekler sonikasyon cihazı ile patlatıldı. Ardından 14.800 rpm'de 15



dk. santrifüj edildi ve süpernatant kısmı alındı. Liyofilizatör cihazı ile protein örnekleri yoğunlaştırıldı.

#### **2.4.10. Protein Konsantrasyon Tayini**

Liyofilize edilen protein örneklerin protein konsantrasyonlarının belirlenmesi, Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. Bu metotta orijinali kırmızı olan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlandığında maviye dönüşmesi esas alınmaktadır. Öncelikle 100 mL'lik Bradford boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası tartıldı. Ardından 5 ml %95'lik etanol içerisinde iyice çözüldü. Üzerine 10 mL %85'lik fosforik asit ilave edilir ve 100 mL'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek temizlendi. Hazırlanan boya çözeltisi +4°C'de saklanır.

Kalibrasyon eğrisini hazırlamak için BSA kullanıldı. Bunun için; 2, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler, 0,15 M'lık NaCl solüsyonu ile 100 µL'ye tamamlandı. Ardından üzerine 3'er mL yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Örnekler için BSA yerine 10 µL her bir bakteriden izole edilen protein özütü kullanılarak aynı işlem gerçekleştirildi. Daha sonra 595 nm'de konsantrasyonları ölçüldü ve mg/ml cinsinden protein miktarları hesaplandı.

#### **2.4.11. DyP-tipi Peroksidaz Enzimi İçin Zimogram Analizi**

Zimogram analizi ile DyP-tipi peroksidaz aktivitesini tayin edebilmek için substrat olarak *o*-dianisidin kullanıldı. Bunun için, toplanan örneklerin konsantrasyonları hesaplandıktan sonra, bakteri pellet ve süpernatantlardaki proteinlerden uygun miktarlarda örnek alınarak, bu ürünlere eşit miktarda 2X muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8 ve %20 gliserol) ilave edildi. Ardından, numuneler %15'lik native poliakrilamid jelle (PAGE) yüklendi. 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için 16 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel, jel boyama solüsyonu (50 mg/mL *o*-dianisidin, 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 5,5) ve 0,75 ml %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile muamele edildi. 5-10 dakika sonra peroksidaz aktivitesi gösteren protein bantları şeffaf

zemin üzerinde koyu kırmızı-kahverengi olarak görüldü (Mliki ve Zimmermann, 1992; Sahinkaya vd., 2018).

## 2.5. Moleküler Çalışmalar

### 2.5.1. Primer Sentezi

*B. megaterium* ve *B. licheniformis* bakterilerinde bulunan DyP-tipi peroksidaz genlerini PCR yöntemi ile çoğaltmak için, DYP-F ve DypLipR\_HindIII primerleri tasarlandı. *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içerecek şekilde primerler tasarlandı (Tablo 8).

Tablo 8. DyP-tipi peroksidaz genlerini çoğaltmak için kullanılan primerler.

Primerin Adı	Primerin Baz Dizini	Restriksiyon Enzim Kesim Bölgesi
DYP-F	5' -CCA TGG GCG ATG AAC AGA AAA AGC-3' 24 bp	<i>NcoI</i>
DypLipR_HindIII	5' -AAG CTT CTA TGA TTC CAG CAA ACG-3' 24 bp	<i>HindIII</i>

### 2.5.2. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

*B. megaterium* ve *B. licheniformis* bakterileri, LB sıvı besiyerinde, bir gece boyu, 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, bu bakterilerden Promega firmasına ait Wizard® Genomik DNA Saflaştırma Kiti kullanılarak genomik DNA'lar izole edildi. Bu kitin protokolüne göre; öncelikle bir gece boyu inkübe edilmiş sıvı kültürler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 xg'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüj sonrasında, süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pellet üzerine, 480 µl 50 mM EDTA ilave edilerek vortekslendi. Ardından, 10 mg/ml'lik konsantrasyondaki lizozimden 120 µl ilave edildikten sonra, nazikçe pipetleme yapılarak pellet iyice çözüldü. Ardından pelletler 37°C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 16.000 xg'de 2 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Geriye kalan pellet üzerine 600 µl Nuclei Lysis solüsyonu ilave edilerek pipetleme ile çözüldü. Hemen bu işlemin ardından, pelletler 80°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra oda

sıcaklığına kadar soğutuldu ve üzerine 3 µl RNaz solüsyonu eklendi. Örnekler alt üst edildikten sonra 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Daha sonra, 200 µl Protein Precipitation solüsyonu eklenip 20 sn vorteksledikten sonra, örnekler 5 dk buzda bekletildi. Bu süre sonunda 16.000 xg'de 3 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 600 µl oda sıcaklığında izopropanol eklendi. Genomik DNA görünür hale gelene kadar örnekler yavaşça alt üst edildi ve 16.000 xg'de 2 dk santrifüj edildi. Pelletin üzerine 600 µl oda sıcaklığında %70'lik etanol eklendi ve iyice karışmaya kadar alt üst edilerek, 13.000 xg'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı döküldükten sonra tüplerdeki etanolün tamamen uzaklaştırılması için, örnekler 20 dk. 37°C'de bekletildi. Etanol tamamen uzaklaştırıldığında, pellet üzerine 100 µl DNA rehidrasyon solüsyonu eklendi ve 65°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Bu süre zarfında DNA'nın solüsyon içinde iyice çözünmesi için ara ara alt üst edilmiştir. En sonunda, elde edilen genomik DNA'lar kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklandı.

### **2.5.3. DyP-tipi Peroksidaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi**

DYP-F ve DypLipR\_HindIII primerleri yardımıyla *B. megaterium* ve *B. licheniformis* bakterilerine ait oldukları düşünülen DyP-tipi peroksidaz genlerini çoğaltmak için bu bakterilere ait izole edilmiş genomik DNA'ları kalıp olarak kullanılarak gradient PCR gerçekleştirildi. Tasarlanan primerlerle gerçekleştirilen PCR reaksiyonu bileşenleri Tablo 9'daki gibidir. Gradient PCR şartları; 95°C'de 5 dakikalık ön bir denatürasyon basamağı, ardından 36 döngü boyunca sırasıyla 94°C'de 30 sn. denatürasyon, 42, 45, 47 ve 50°C sıcaklıklarında 1 dk. bağlanma (annealing) ve 72°C'de 1 dk. uzama (extention) basamakları ve son olarak son uzama basamağı da 72°C'de 5 dk. şeklindedir (Tablo 10).

Tablo 9. *B. megaterium* ve *B. licheniformis* türlerine ait DyP-tipi peroksidaz genlerini çoğaltmak için gerçekleştirilen PCR şartları.

Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) bileşenleri (25 µL)	Hacim
5X Renkli PCR tamponu	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µL
dNTP mix (1 mM)	0,5 µL
DYP-F (10 µM)	0,5 µL
DypLipR_HindIII (10 µM)	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	16,3 µL
Taq DNA polimeraz	0,2 µL
Kalıp DNA	0,5 µL

PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelin sonuçları BioRad Gel Doc™ XR+ Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntüledi. Ardından PCR ile çoğaltılan DyP-tipi peroksidaz genleri, pGEM-T® Easy klonlama vektörü kullanılarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 11). Bu işlemin ardından elde edilen ligasyon ürünü, *E. coli* JM101 kompetent hücrelerine CaCl<sub>2</sub> metoduyla transforme edildi. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, TENS (URL-4, 2019) yöntemiyle izole edildi ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek rekombinant koloniler seçildi. Klon varlığını teyit etmek için *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu gerçekleştirildi ve pozitif klonlar tespit edildi.

Tablo 10. *B. megaterium* ve *B. licheniformis* türlerine ait genomik DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen DyP-tipi peroksidaz genlerinin eldesi için farklı sıcaklıklardaki gradient PCR şartları.

Sıcaklık (°C)	Süre(dk.)	Döngü sayısı
95°C	5:00	1
94°C	0:30	36
42/45/47/50°C	1:00	36
72°C	1:00	36
72°C	5:00	1
12°C	∞	1

Tablo 11. *B. megaterium* ve *B. licheniformis* türlerine ait DyP-tipi peroksidaz genlerinin ligasyon prosedürü.

Reaksiyon bileşenleri (10 µL)	Hacim
2X Rapid Ligation T4 DNA ligaz tamponu	5 µL
Kalıp DNA	3 µL
pGEM-T Easy klonlama vektörü (50 ng/µL)	1 µL*
T4 DNA ligaz (1 ünite)	1 µL

\* 1:1 sulandırılmış vektör



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Karbon Kaynağını ve Optimum Konsantrasyonunu Belirlemek İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

En iyi renk gideriminin meydana geldiği karbon kaynağını belirlemek için, 144 saat boyunca *B. licheniformis* ve *B. megaterium* bakterileriyle gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sürecinde toplanan örneklerin 280 nm'de absorbansları ölçüldü. Negatif kontrol ile kıyaslandığında, en fazla renk gideriminin %1 (w/v) fruktozlu %5 (v/v) SL-MSM besiyerinde olduğu belirlendi (Tablo 12). 72 saat sonunda, *B. licheniformis* bakterisi yaklaşık olarak %16 oranında ve *B. megaterium* bakterisi %13,2 oranında siyah likörün rengini giderdiği belirlendi.

Ardından, farklı konsantrasyonlarda fruktozlu %5 SL-MSM besiyerleri hazırlandı. Bakteriler 144 saatlik optimizasyon çalışmaları boyunca toplanan örneklerin 280 nm'de absorbansları ölçüldü (Tablo 13). Ölçümler sonucunda en iyi renk gideriminin %1 fruktozlu %5 SL-MSM besiyerinde olduğu belirlendi. 72 saat sonunda, *B. licheniformis* bakterisi yaklaşık olarak %13,1 oranında ve *B. megaterium* bakterisi %12,3 oranında siyah likörün rengini giderdiği belirlendi.

Ayrıca, bakterilerle gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları boyunca CFU analizleri yapıldı (Şekil 6-7). Bu analizlere göre, bakterilerin en iyi çoğaldığı karbon kaynağı fruktoz ve konsantrasyonu %1 (w/v) olarak tespit edildi.

Tablo 12. %1 karbon kaynaklı %5 SL-MSM besiyerindeki *B. licheniformis* ve *B. megaterium*'a ait renk giderme yüzdeleri.

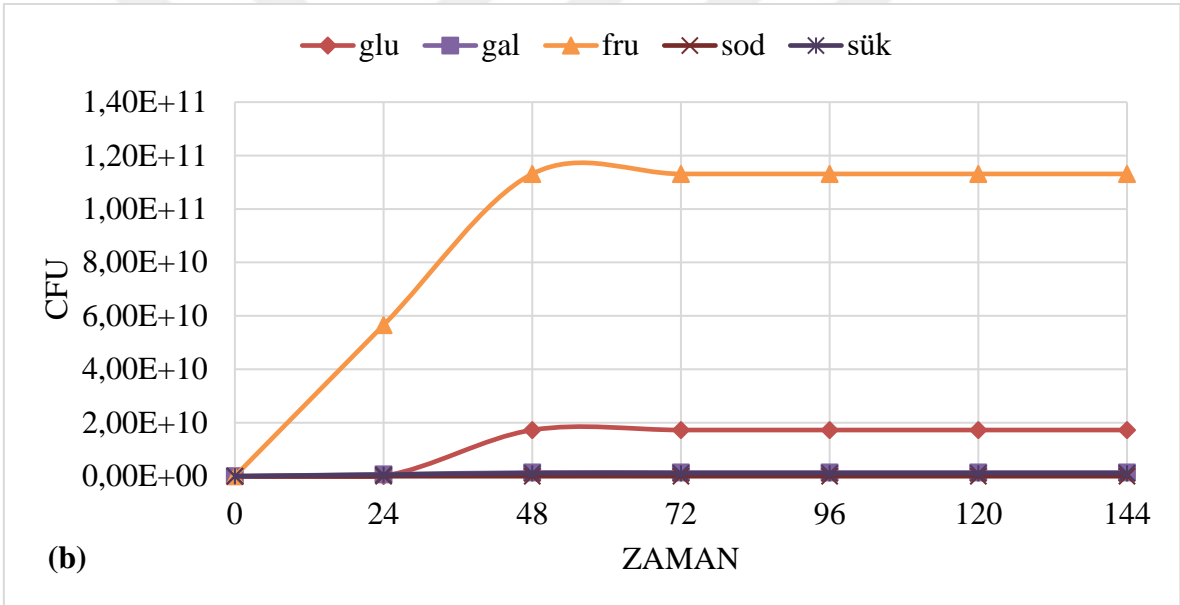
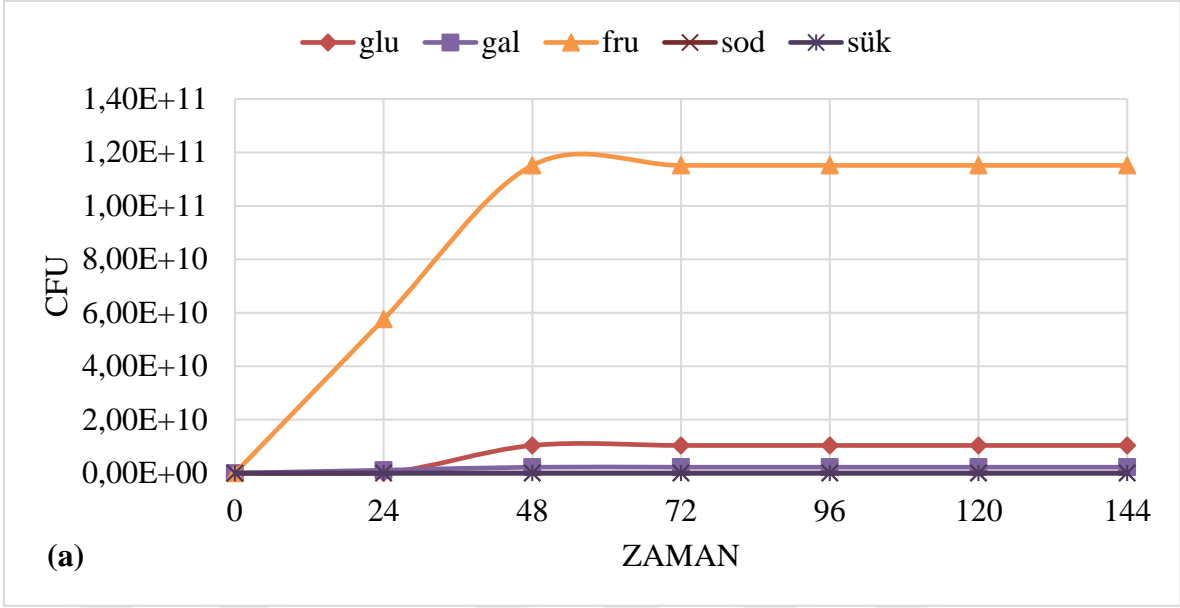
%5 SL-MSM pH 7,6; %1 (w/v) glukoz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%4,33	%3,79	%0,00	%0,00	%0,00	%0,00%
<i>B. megaterium</i>	%5,92	%6,20	%0,18	%0,00	%2,38	%3,10

%5 SL-MSM pH 7,6; %1 (w/v) galaktoz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%2,67	%1,65	%3,65	%0,00	%0,00	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%0,00	%0,00	%4,52	%2,73	%0,00	%0,00

%5 SL-MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%5,10	%5,60	%15,90	%0,98	%0,46	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%6,51	%8,04	%13,20	%2,38	%3,10	%0,00

%5 SL-MSM pH 7,6; %1 (w/v) sodyum asetat						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%3,00	%0,00	%2,63	%0,00	%0,00	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%1,74	%2,46	%5,95	%0,00	%0,98	%0,46

%5 SL-MSM pH 7,6; %1 (w/v) sükroz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%1,00	%0,00	%0,00	%4,55	%0,00	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%5,65	%2,01	%1,18	%7,93	%0,00	%0,00



Şekil 6. %1 karbon kaynaklı %5 SL-MSM besiyerindeki *B. licheniformis* (a) ve *B. megaterium* (b) bakterilerinin CFU analizleri.



Tablo 13. Değişen konsantrasyonlarda fruktozlu %5 SL-MSM besiyerindeki *B. licheniformis* ve *B. megaterium*'a ait renk giderme yüzdeleri.

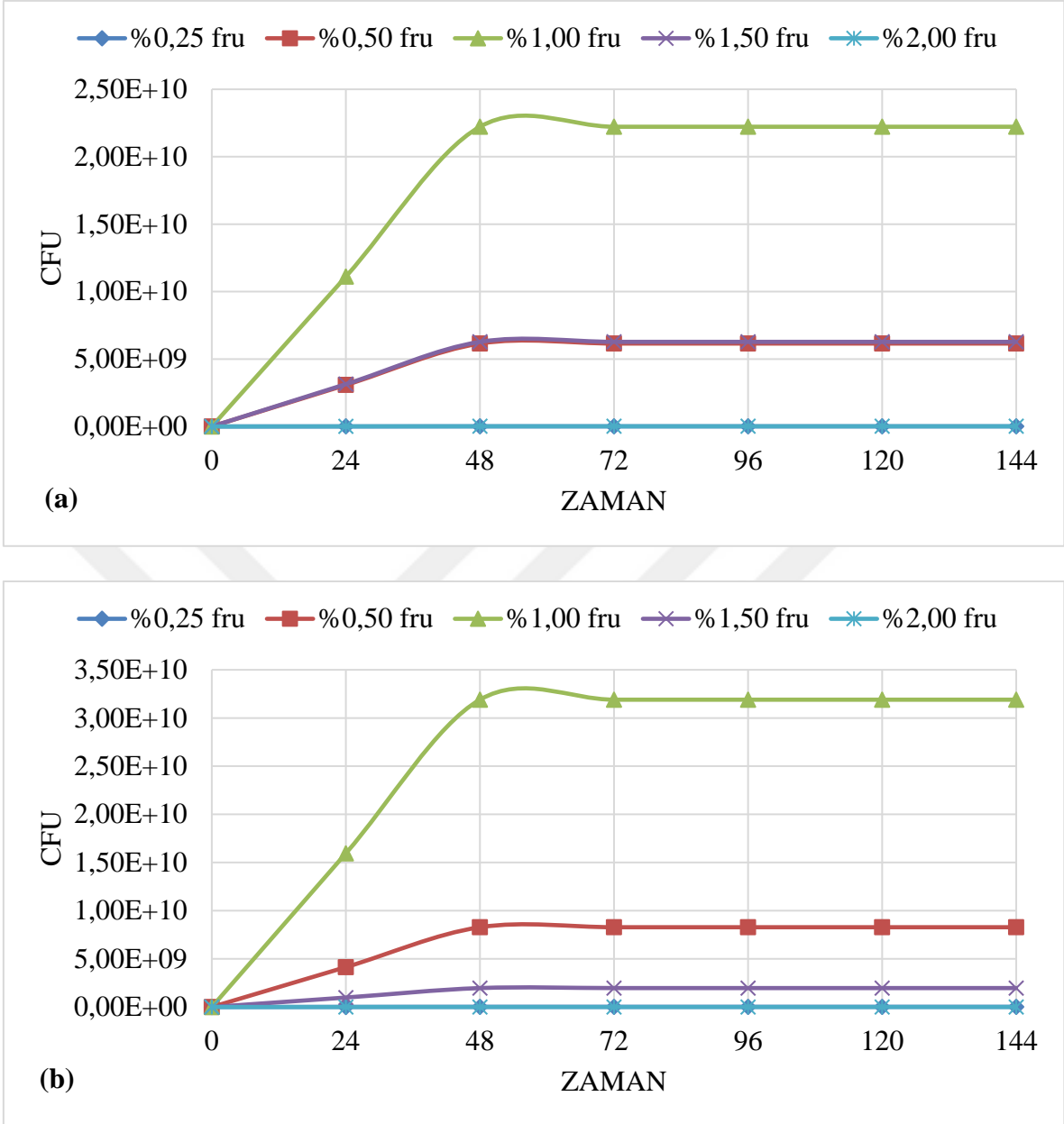
%5 SL-MSM pH 7,6; %0,25 (w/v) fruktoz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%0,42	%1,24	%5,26	%1,89	%0,00	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%6,98	%6,35	%0,18	%3,35	%0,00	%2,70

%5 SL-MSM pH 7,6; %0,50 (w/v) fruktoz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%4,55	%2,37	%6,90	%0,51	%1,55	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%3,03	%5,24	%4,52	%1,16	%2,43	%0,00

%5 SL-MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%5,24	%8,60	%13,09	%6,55	%3,22	%0,14
<i>B. megaterium</i>	%5,98	%7,27	%12,29	%7,50	%2,40	%0,62

%5 SL-MSM pH 7,6; %1,5 (w/v) fruktoz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%2,48	%3,00	%4,00	%2,75	%3,64	%0,64
<i>B. megaterium</i>	%5,29	%0,00	%5,95	%3,88	%2,18	%2,54

%5 SL-MSM pH 7,6; %2 (w/v) fruktoz						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%3,35	%4,68	%0,37	%1,88	%0,02	%0,20
<i>B. megaterium</i>	%2,46	%4,90	%0,55	%4,65	%0,09	%0,93



Şekil 7. Değişen konsantrasyonlarda fruktozlu %5 SL-MSM besiyerindeki *B. licheniformis* (a) ve *B. megaterium* (b) bakterilerinin CFU analizleri.

### 3.2. Azot Kaynağını ve Optimum Konsantrasyonunu Belirlemek İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

En iyi renk gideriminin meydana geldiği karbon kaynağını belirlemek için, 144 saat boyunca *B. licheniformis* ve *B. megaterium* bakterileriyle gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sürecinde toplanan örneklerin 280 nm’de absorbansları ölçüldü. Negatif kontrol ile kıyaslandığında, en fazla renk gideriminin %1 pepton içeren %1 fruktozlu %5 SL-MSM besiyerinde olduğu belirlendi (Tablo 14). 72 saat sonunda, *B. licheniformis* bakterisi

yaklaşık olarak %8,4 oranında ve 24 saat sonunda, *B. megaterium* bakterisi yaklaşık olarak %11,6 oranında siyah likörün rengini giderdiği belirlendi.

Ardından, farklı konsantrasyonlarda pepton içeren %1 fruktozlu %5 SL-MSM besiyerleri hazırlandı. Bakteriler 144 saat boyunca çoğaltıldıktan sonra 280 nm’de ölçüldü (Tablo 15). Ölçümler sonucunda en iyi renk gideriminin %1 fruktozlu %5 SL-MSM besiyerinde olduğu belirlendi. 72 saat sonunda, *B. licheniformis* bakterisi yaklaşık olarak %13,1 oranında ve *B. megaterium* bakterisi %12,3 oranında siyah likörün rengini giderdiği belirlendi.

Ayrıca, bakterilerle gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları süresince CFU analizleri yapıldı (Şekil 8-9). Bu analizlere göre, bakterilerin en iyi çoğalmayı gösterdiği azot kaynağı pepton ve konsantrasyonu %1,5 (w/v) olarak tespit edildi.

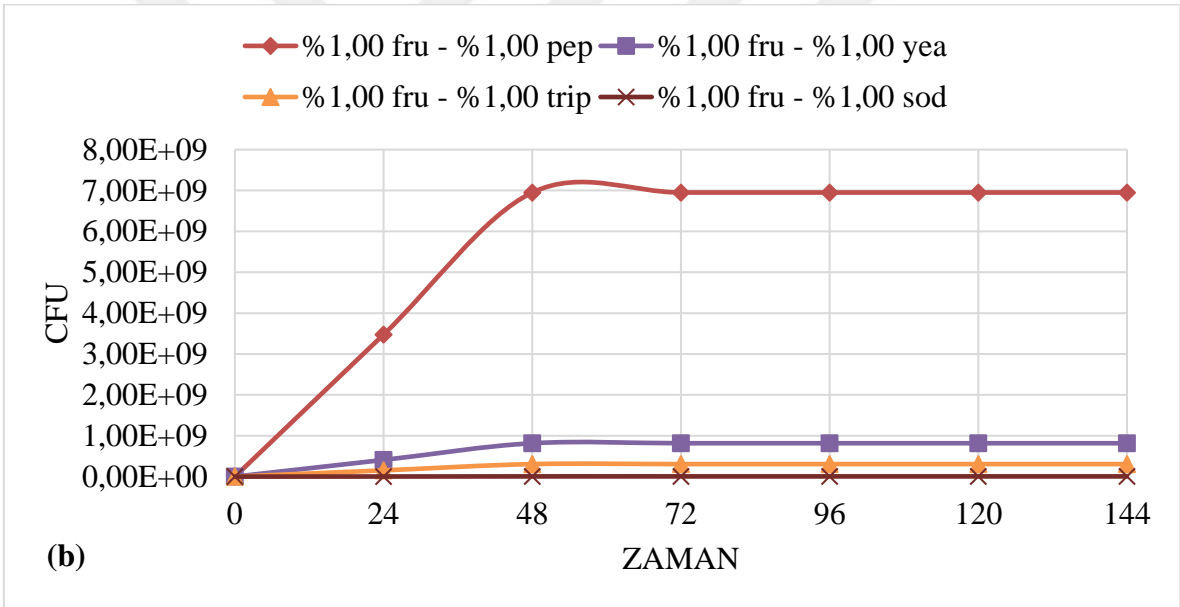
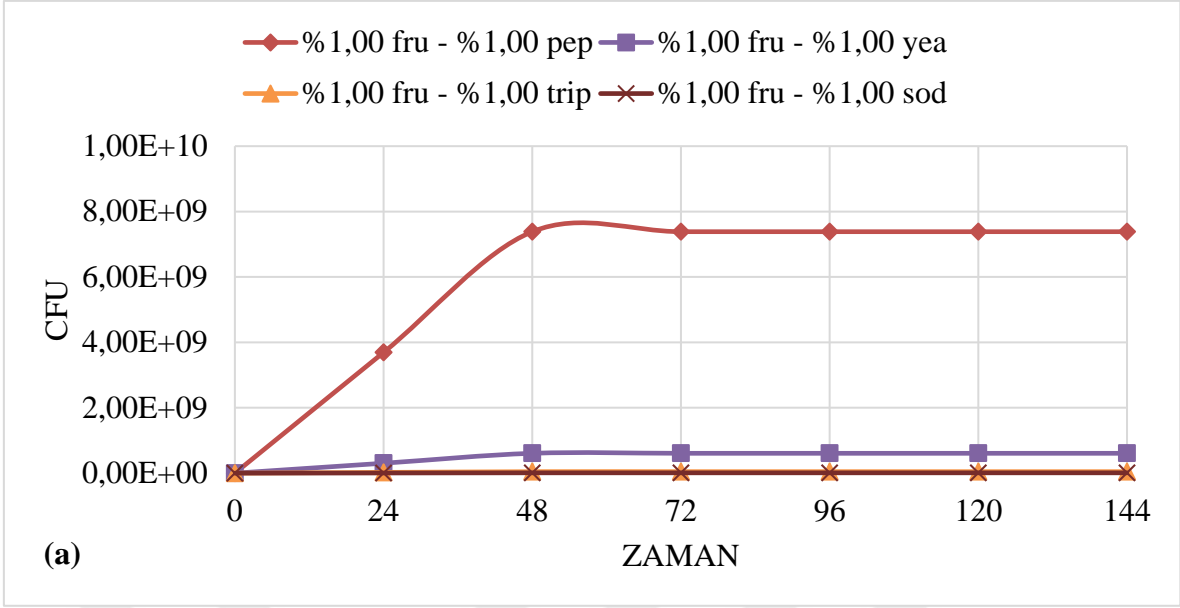
Tablo 14. %1 azot kaynaklı ve %1 fruktoz içeren %5 SL-MSM besiyerindeki *B. licheniformis* ve *B. megaterium*’a ait renk giderme yüzdeleri.

MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %1 (w/v) pepton						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%5,62	%6,34	%8,39	%8,20	%1,45	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%11,57	%5,87	%8,04	%5,65	%0,00	%0,00

MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %1 (w/v) maya ekstraktı						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%0,00	%1,65	%0,00	%5,60	%0,09	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%0,00	%0,00	%0,52	%0,00	%0,09	%0,00

MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %1 (w/v) tripton						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%3,29	%0,00	%0,00	%0,00	%0,00	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%0,00	%2,00	%0,18	%0,00	%0,00	%0,31

MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %1 (w/v) sodyum nitrat						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%0,00	%3,00	%0,00	%0,00	%0,00	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%1,74	%0,00	%5,95	%0,00	%0,00	%0,00



Şekil 8. %1 azot kaynaklı ve %1 fruktoz içeren %5 SL-MSM besiyerindeki *B. licheniformis* (a) ve *B. megaterium* (b) bakterilerinin CFU analizleri.

Tablo 15. Değişen konsantrasyonlarda pepton içeren %1 fruktozlu %5 SL-MSM besiyerindeki *B. licheniformis* ve *B. megaterium*'a ait renk giderme yüzdeleri.

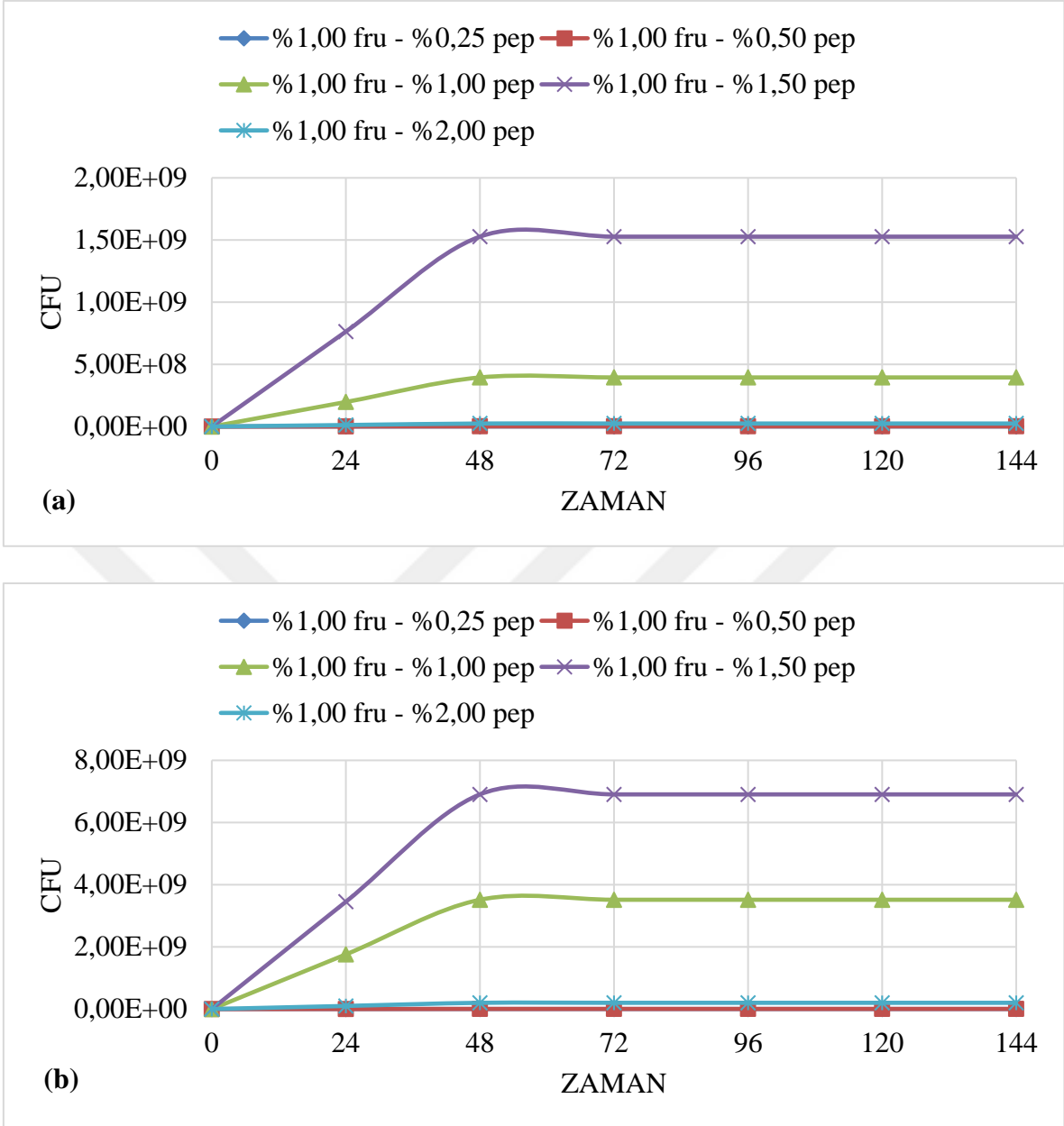
MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %0,25 (w/v) pepton						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%7,14	%0,00	%0,00	%3,53	%0,00	%1,65
<i>B. megaterium</i>	%5,07	%2,00	%3,18	%1,52	%0,58	%0,37

MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %0,50 (w/v) pepton						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%4,98	%1,65	%0,00	%4,35	%4,65	%0,65
<i>B. megaterium</i>	%5,65	%1,18	%0,52	%4,11	%7,97	%0,98

MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %1 (w/v) pepton						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%0,00	%9,11	%8,90	%0,00	%4,46	%1,66
<i>B. megaterium</i>	%1,74	%0,00	%6,52	%5,78	%7,73	%9,82

MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %1,5 (w/v) pepton						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%5,90	%7,10	%15,90	%5,78	%7,73	%1,18
<i>B. megaterium</i>	%7,78	%7,51	%10,52	%8,08	%9,11	%0,24

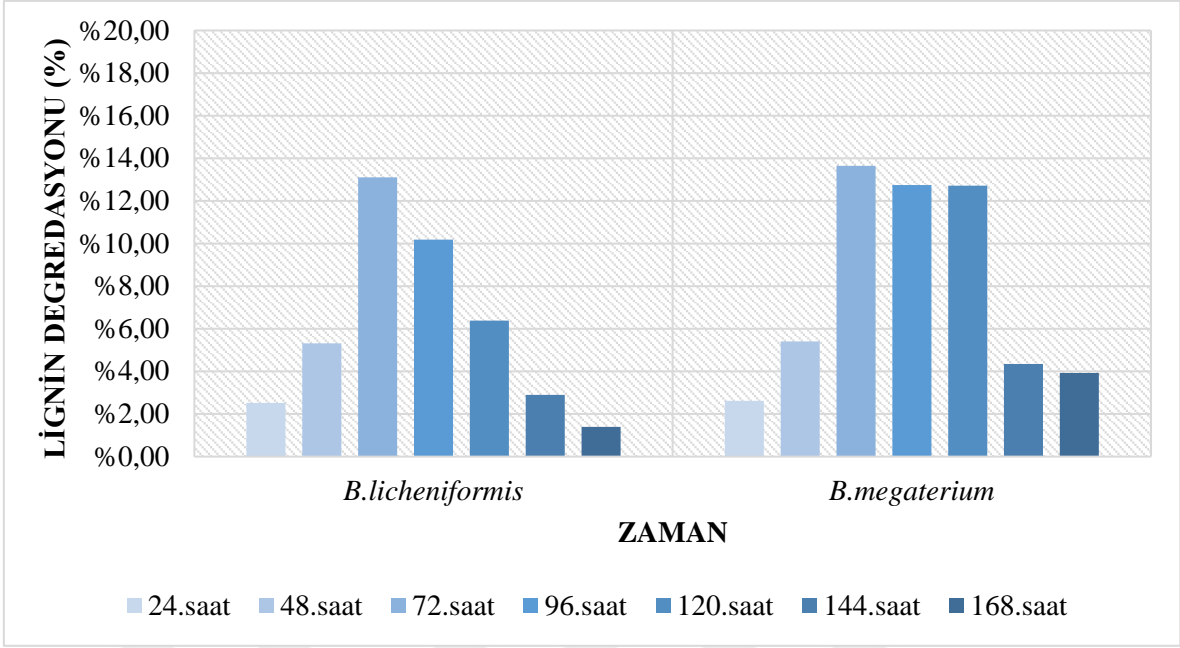
MSM pH 7,6; %1 (w/v) fruktoz, %2 (w/v) pepton						
	24.saat	48.saat	72.saat	96.saat	120.saat	144.saat
<i>B. licheniformis</i>	%1,74	%0,00	%5,95	%5,78	%7,88	%0,00
<i>B. megaterium</i>	%5,65	%2,01	%1,18	%0,01	%2,15	%0,78



Şekil 9. Değişen konsantrasyonlarda pepton içeren %1 fruktozlu %5 SL-MSM besiyerindeki *B. licheniformis* (a) ve *B. megaterium* (b) bakterilerinin CFU analizleri.

### 3.3. Lignin Degredasyonunun Belirlenmesi

Bu yöntem için; uygun karbon ve azot kaynaklarını içeren %5 SL-MSM (pH 7,6) besiyeri hazırlandı. *B. megaterium* ve *B. licheniformis* bakterileri 7 gün boyunca bu besiyerinde çoğaltıldı. 7 gün boyunca toplanan örneklerin süpernatantlarına Pearl ve Benson'ın geliştirdiği metot uygulandı (Şekil 10).



Şekil 10. Optimum şartlarda *B. licheniformis* ve *B. megaterium*'a ait lignin degradasyon sonuçları.

### 3.4. Lignin Degradasyon Zonunun Gözlenmesi

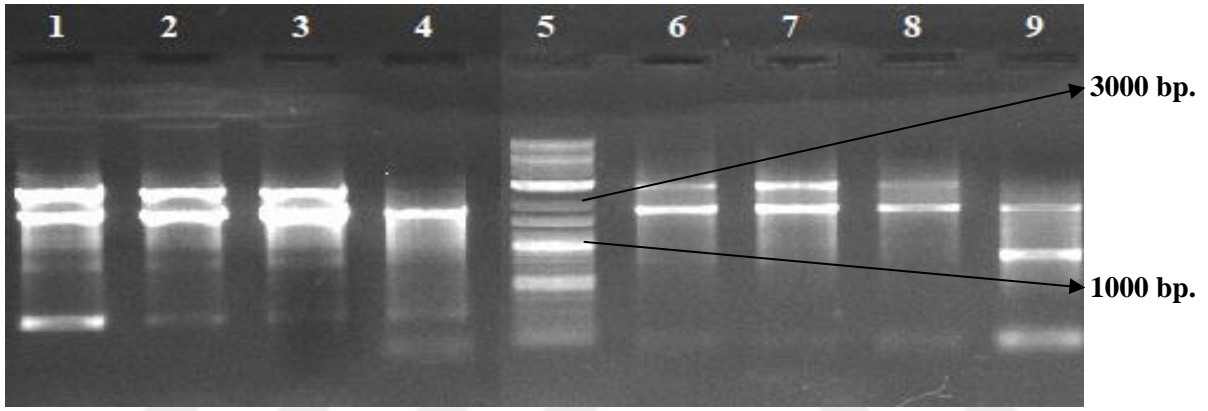
Bir gece boyu KL'li MSM besiyerinde büyütülen *B. megaterium* ve *B. licheniformis* bakterilerinden alınan örneklerin süpernatantlarından 100µl inoküle edildi ve bir gece boyu bakteriler için 37°C'de bırakıldı. Ertesi gün oluşan zonlar incelendi (Şekil 11).



Şekil 11. Metilen mavisi (a) ve kraft lignin (b) içeren LBM agar besiyeri üzerine ilave edilen *B. megaterium* ve *B. licheniformis* süpernatantlarının bir gün sonra oluşan zonlarının görüntüsü.

### 3.5. *B. megaterium* ve *B. licheniformis* Türlerine Ait DyP-tipi Peroksidaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektörüne Klonlanması

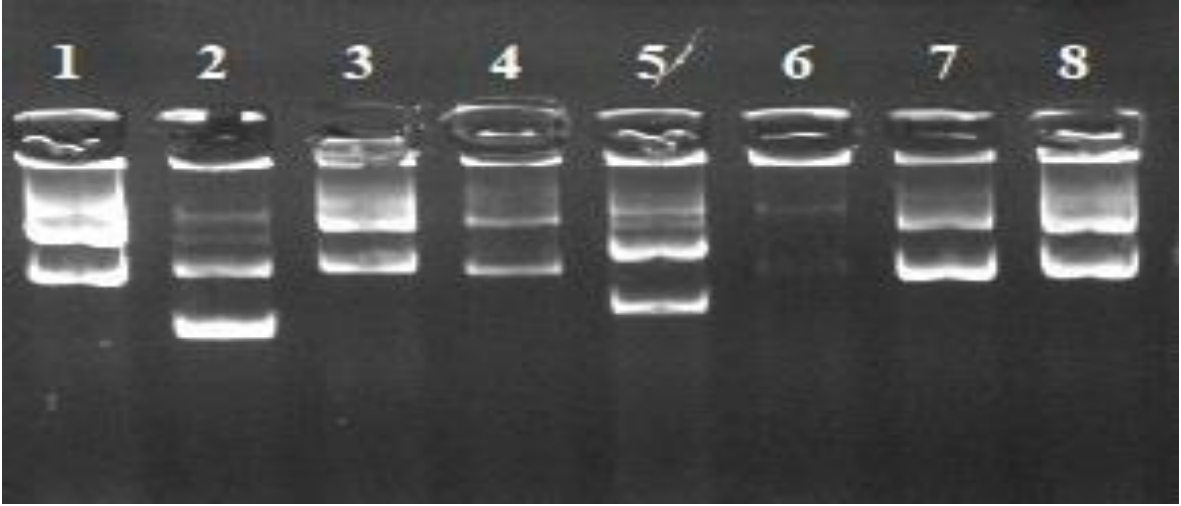
Bakterilerden izole edilen LB besiyeri içerisinde çoğaltılan *B. megaterium* ve *B. licheniformis* bakterilerine ait DyP-tipi peroksidaz genleri sırasıyla 42, 45, 47 ve 50°C sıcaklıklarında PCR ile çoğaltıldı. PCR sonucunda oluşan ürünler, %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Bantların büyüklüklerini belirlemek için DNA markörü kullanıldı (Şekil 12).



Şekil 12. *B. megaterium* (1-4) ve *B. licheniformis* (6-9) bakterilerinin 42/45/47/50°C sıcaklıklarında gerçekleştirilen DyP-tipi peroksidaz geni için gradient PCR sonuçları, DNA markörü (5).

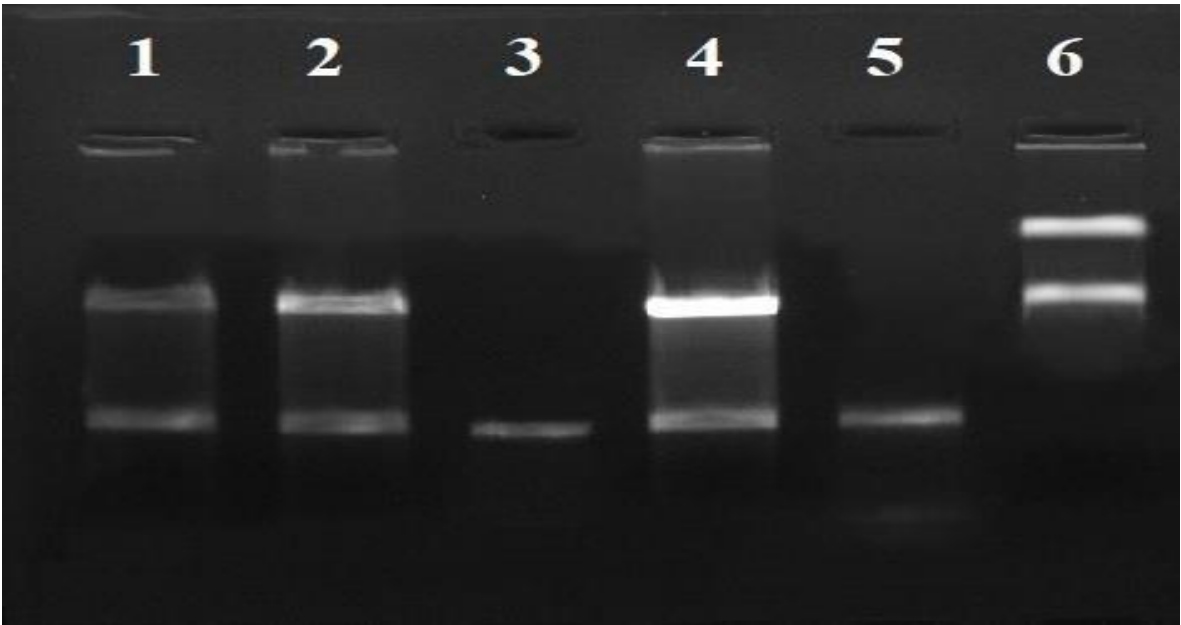
Gradient PCR sonuçlarına ve literatürlerdeki çalışmalara dayanarak 1200-1400 bp civarındaki bantlar jelden kesilerek çıkartıldı. Ardından jelden izole edilen bantlar öncelikle, pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörüne klonlandı. Daha sonra, *E. coli* JM101 kompetent hücreleri içerisine aktarıldı. Ertesi gün, klon olarak düşünülen koloniler seçildi ve plazmitleri TENS yöntemiyle izole edildi (Şekil 13).





Şekil 13. *B. licheniformis* (1-4) ve *B. megaterium*'un (6-8) TENS yöntemi ile izole edilen, DyP-tipi peroksidaz geni klonlanmış pGEM-T Easy klon plazmitlerinin görüntüsü. Klonlama yapılmayan pGEM-T Easy vektörü (5).

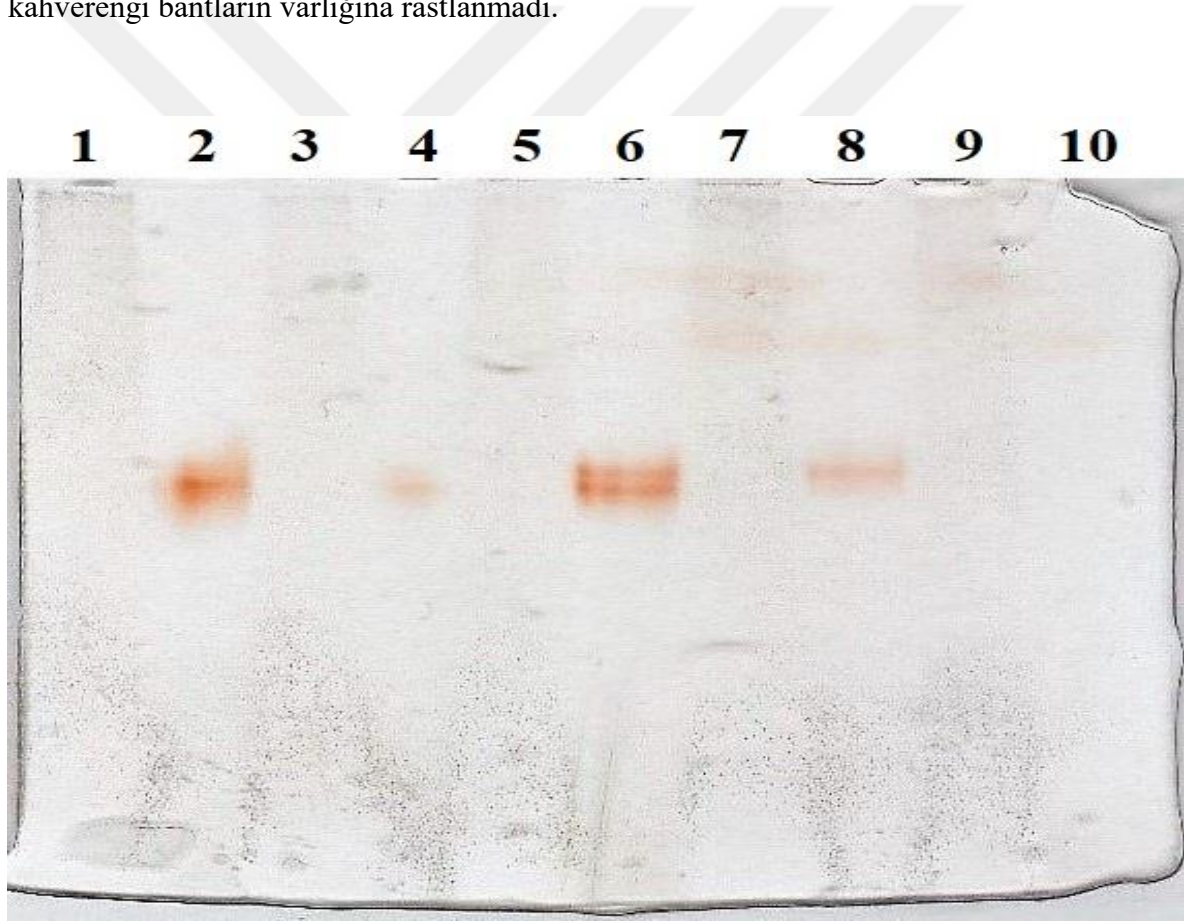
%1'lik agaroz jelde yürütülerek vektöre klonlanan DyP-tipi peroksidaz genini içerebilecek ilgili klonlar seçildi, *EcoRI* ile kesilerek vektör içerisindeki genin varlığı teyit edildi (Şekil 14).



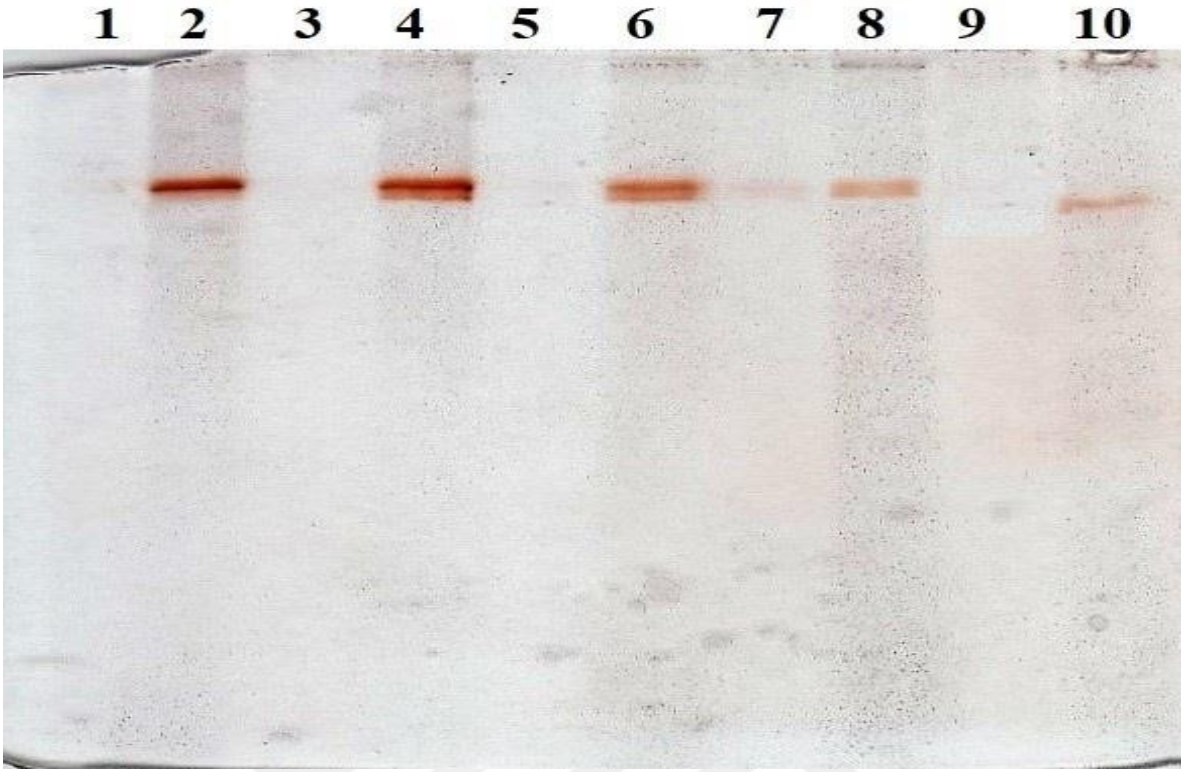
Şekil 14. Seçilen *B. licheniformis*'e (1-2) ve *B. megaterium*'a (4) ait DyP-tipi peroksidaz genlerini içeren pGEM-T Easy klonlarının *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesimleri. Klonlama yapılmayan pGEM-T Easy vektörü (6), *B. licheniformis* (3) ve *B. megaterium* (5)'a ait DyP-tipi peroksidaz genlerinin PCR ürünlerinin *EcoRI* enzimiyle kesimleri şekilde gösterilmiştir.

### 3.6. DyP-tipi Peroksidaz Enzimi İçin Zimogram Analizi

Zimogram analizi ile DyP-tipi peroksidaz aktivitesini görebilmek için substrat olarak *o*-dianisidin kullanıldı. Bunun için, toplanan pellet ve süpernatant örneklerinin konsantrasyonlarına göre uygun miktarlarda numuneler yüklendi ve %15'lik native poliakrilamid jelde yürütüldü. Yürütülme işleminin bitmesinin ardından jel boyama solüsyonu ile muamele edildi. 5-10 dk. sonrasında *B. licheniformis* bakterisinin süpernatant ve *B. megaterium* bakterisinin pellet örneklerinde, 24. saatten itibaren koyu kırmızı-kahverengi bantların varlığına rastlandı (Şekil 15-16). *B. licheniformis* bakterisinin pellet örneklerinde ve *B. megaterium* bakterisinin süpernatant örneklerinde koyu kırmızı-kahverengi bantların varlığına rastlanmadı.



Şekil 15. *B. licheniformis* bakterisinin sırasıyla 24-144. saatleri arasında, MSM (1,3,5,7,9) ve %0,75 KL'li MSM (2,4,6,8,10) besiyerinde çoğaltıldıktan sonra elde edilen süpernatant örneklerinden yapılan DyP-tipi peroksidaz zimogram analiz sonuçları.



Şekil 16. *B. megaterium* bakterisinin sırasıyla 24-144. saatleri arasında, MSM (1,3,5,7,9) ve %0,75 KL'li MSM (2,4,6,8,10) besiyerinde çoğaltıldıktan sonra elde edilen pellet örneklerinden yapılan DyP-tipi peroksidaz zimogram analiz sonuçları.

#### 4. TARTIŞMA

Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi günümüzdeki en büyük endüstrilerinden birisidir. Kâğıt yapımında kullanılan ham madde lignoselülozdur. Kâğıt hamuru yapım süreci esnasında lignin ve hemiselülozları, lignoselülozdan ayırmak için odun parçaları kimyasalların varlığında, çok yüksek sıcaklık ve basınç altında pişirilmektedir. Bu işlem sonucunda çeşitli kirletici ve toksik maddelerin bir arada bulunduğu (lignoselülozik malzemeler, lignosülfonik asitler, klorlu reçine asitleri vb.) siyah likör adı verilen atık su meydana gelmektedir. Uluslararası Lignin Enstitüsü (ILI)'ne göre, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi sayesinde her yıl yaklaşık olarak  $30 \times 10^{10}$  ton lignin üretilmekte ve bunların sadece  $2 \times 10^{10}$  tonu (yaklaşık %2'si; lignosülfonatlar veya kraft işleminden elde edilen lignin halinde) işlenmektedir ve ticari olarak piyasaya sürülmektedir (Toledano vd., 2010; Schoenherr vd., 2019). İşlenmemiş ligninin neredeyse tamamına yakını (yaklaşık olarak %90-95) siyah likörde çözünür halde bulunmaktadır (Chandra vd., 2007).

Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinin atık suyu olan siyah likör, havayı ve toprağı kirleterek çevreye ve içinde bulunduğu sucul ve karasal ekosistemlere büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Çeşitli araştırmalarda, kâğıt ve kâğıt hamuru atık suyunun arıtılmadan döküldüğü sulak alanlarda yaşayan hayvanların üzerindeki zararlı etkilerini bildirilmiştir. Bu zararlı etkilerin en göze çarpanları; solunum stresi, oksidatif stres, karaciğer hasarı ve genotoksisitedir (Vass vd., 1996; Schnell vd., 2000; Chandra ve Singh, 2012). Bu kirleticilerin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılan çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerin bazıları sert koşullar ve yüksek enerji girişi gerektirir, bazıları ise oldukça maliyetlidir. Bu açıdan biyolojik yöntemler, özgün ve etkili bir alternatif sunması nedeniyle lignin dönüşümü için ideal bir yaklaşım olarak görülmektedir (Chen ve Wan, 2017). Mikroorganizmaların kullanıldığı biyokatalitik süreçler, lignini çevre dostu hale getirebilmekte ve zararsız alt formlarına ayrıştırabilmektedir.

Mikroorganizmalar, siyah likör gibi atık maddelere ürettikleri enzimlerin etkisiyle ve biyosorpsiyonla müdahalede bulunmaktadır (Park vd., 2007). Lignin degradasyonu ile ilgili araştırmalar genellikle funguslarla yapılmıştır ve bu organizmalarla başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Janusz vd., 2017). Bu yüzden, funguslar birincil lignin ayrıştırıcıları olarak tercih edilmektedir. Ancak funguslara nazaran, bakteriler daha geniş pH, sıcaklık ve oksijen aralıklarını tolere edebilmekte ve manipülasyonları daha kolay olabilmektedir.

Ayrıca, bakteriler anaerobik koşullara muazzam bir adaptasyon sergilemekte, sıcaklık, pH ve oksijen sınırlamalarına karşı tolerans gösterebilmektedir (Wu ve He, 2013). Bakteriyel lignin degradasyonunun fungal sistemlerden daha özgül olduğuna dair kanıtlar da mevcuttur (Vicuña, 1988; Zimmermann, 1990; Mliki ve Zimmermann, 1992). Bu açıdan, özellikle kâğıt ve kâğıt hamurunda bakterilerin uygulamaları ile ilgili araştırmalar günden güne artmaktadır. Literatürler tarandığında, özellikle *Bacillus* cinsi ile alakalı son yıllarda lignin degradasyonu ve renk giderimi hakkında çalışmalar bulunmaktadır (Hoopa vd., 2018; Verma ve Ekka, 2018; Sapapporn vd., 2019; Zainith vd., 2019). Yukarıda ifade edilen bilgilerin ışığında, gerçekleştirilen bu çalışmada, *Bacillus licheniformis* ve *B. megaterium* bakterileri kızılçam siyah likörüne uygulanmış ve uygulama şartları optimize edilmeye çalışılmıştır.

Biyolojik yöntemlerin amacı, besin oranlarının optimizasyonu (hedef kirleticileri parçalayabilen seçilmiş mikroorganizmaların çoğalmalarını teşvik etmek için) ve uygun bir şekilde seçilmiş izole edilmiş mikroorganizma suşlarının ilgili maddeleri degrades edebilme kabiliyetlerini ele alan uygulamalardır (Ravichandran vd., 2018). Singhal ve Thakur'un 2009 yılında yaptıkları bir araştırmada bir fungus türü olan *Emericella nidulans* (anamorfu *Aspergillus nidulans*)'ın şeker kamışı küspesi atık suyuna uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmalarda besiyeri olarak %10 atık su içeren MSM kullanılmıştır. Karbon kaynakları olarak; sükroz, dekstroz, sodyum asetat ve sodyum sitrat ve azot kaynakları olarak; maya ekstraktı, tripton, pepton ve sodyum nitrat tercih edilmiştir. Uygulamalar ise üç kez tekrarlanmıştır. 35°'de ve 125 rpm'de, 24 saat sonucunda, %0,25 dekstroz ile %0,1 tripton içeren besiyerinde; atık suyun rengini %66,6 oranında giderdiği ve içeriğindeki lignini %37 oranında degrades ettiği rapor edilmiştir. Verma ve Ekka'nın 2018 yılında yaptıkları bir araştırmada; 16S rRNA dizi analizleri sonucunda *Bacillus subtilis* türü olduğu anlaşılan bakteri siyah likördeki kraft lignine uygulanmıştır. 30°'de ve 120 rpm'de, %1 glukoz ile %3 pepton içeren kraft ligninli besiyerinde; 168 saat sonunda kraft lignini %18,66 oranında degrades ettiği ve %25,07 oranında rengini giderdiği tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen siyah likör renginin açılması çalışmasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde, değerlerin artan saatlere doğru olmak üzere renk açılma yüzdelerinde artma ve azalmalar şeklinde dalgalanmalar görülmektedir. Bu dalgalanmaların nedenlerinin renk ağartılması üzerinde etkili olan enzimlerin çift yönlü olarak çalışmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tablo 12-15).

Gerçekleştirilen bu çalışmada, *B. licheniformis* ve *B. megaterium* bakterileri ile gerçekleştirilen optimizasyonda; siyah likör konsantrasyonu %5 olarak belirlendi ve besiyeri olarak MSM kullanıldı. Karbon kaynakları olarak, glukoz, galaktoz, fruktoz, sodyum asetat ve sükroz, azot kaynakları olarak tripton, pepton, sodyum nitrat ve maya ekstraktı tercih edildi. 37°'de ve 140 rpm'de gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında *B. licheniformis* ve *B. megaterium* türlerinde maksimum renk giderimi 72 saat sonunda tespit edildi. Karbon kaynağı olarak maksimum renk giderimi, fruktozda (sırasıyla; %15,90 ve %13,20) ve %1 konsantrasyonda (sırasıyla; %13,09 ve %12,29) tespit edildi. Azot kaynağı olarak maksimum renk giderimi ise, peptonda *B. licheniformis* için 72 saat sonunda (%8,39) ve *B. megaterium* için 24 saat sonunda (%11,57) olduğu tespit edildi. %1,5 pepton konsantrasyonunda ve *B. licheniformis* ve *B. megaterium* türlerinde maksimum renk giderimi 72 saat sonunda ve sırasıyla %15,90 ve %10,52 olarak tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar ve literatür bilgileri karşılaştırıldığında optimize şartlar altında her iki bakterinin de yüksek bir renk giderim aktivitesine sahip olmadığı görülmektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, lignin degradasyon yüzdesi Pearl ve Benson (1940) tarafından ortaya konulan yöntemle tespit edildi. Uygun şartlarda kızılçam siyah likörü ile azot ve karbon kaynağı içeren MSM besiyerinde, 168 saat boyunca bakteriler çoğaltıldı. Maksimum lignin degradasyonu 72 saat sonunda, *B. megaterium* ve *B. licheniformis* bakterilerinde sırasıyla %13,65 ve %13,10 oranında tespit edildi.

Literatürler incelendiğinde, *Bacillus megaterium* ve *B. licheniformis* bakterilerinde kızılçam siyah likörünün kullanıldığına dair araştırmalara rastlanılmamaktadır. Literatürlerde genellikle okaliptüs, bambu ve şeker kamışı gibi ham maddelerden kâğıt ve kâğıt hamuru imal eden endüstrilerden açığa çıkan atık sular kullanılmaktadır (Singhal ve Thakur, 2009; Chandra ve Singh, 2012; Şahinkaya vd., 2018). Ayrıca gerçekleştirilen bu çalışmadan elde edilen sonuçlar literatürlerle karşılaştırıldığında her iki bakterininde lignin degradasyon yüzdelerinin düşük olduğu görülebilir. Fakat kızılçam kâğıt hamurundaki lignin oranı yukarıda ifade edilen bitkilerdekine kıyasla daha yoğundur.

Lignolitik enzimler ligninazlar olarak adlandırılmaktadır ve lignin degradasyonunda rol oynayan enzimlerdir (Zimmermann, 1990). Lignin degradasyonunda görev alan birçok enzim bulunmaktadır ve bu enzimlerin başlıcaları ksilanazlar, lakkazlar ve peroksidazlardır (Colpa vd., 2014; Singh vd., 2019). Literatürler incelendiğinde çoğunlukla fungal kaynaklı enzimlere rastlanmaktadır. Tez çalışmasında aydınlatılmaya

çalışılan DyP-tipi peroksidaz ilk kez funguslarda keşfedilmiştir (Kim ve Shoda, 1999). *Bacillus* türlerinin peroksidaz, lakkaz ve ksilanaz enzimlerini üretebildiğine dair araştırmalar bulunmaktadır (Colpa vd., 2014; Raj vd., 2018; Verma ve Ekka, 2018; Brink vd., 2019). Bu raporlardan bazıları enzimlerinin saflaştırılarak denenmesi yönünde, bazıları da kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde bakterilerin potansiyel olarak kullanılabilme yetenekleri üzerinedir.

Sindhu ve ark. (2006)'ların yaptığı bir çalışmada *Bacillus megaterium* bakterisine ait ksilanaz enziminin üretimi katı hal fermentasyonu kullanılarak yaklaşık olarak 423 kat artırıldığı rapor edilmiştir. Bu ksilanazın fırında kurutulmuş kâğıt hamuruna uygulanması ve %10 tutarlılıkla biyoağartma denemeleri sonucunda; parlaklığında %8,12 ve viskozitesinde %1,16 oranında artma gözlenmişken, kapa numarasında %13,67 ve klorin dioksit aşamasında klor tüketiminde %31 oranında azalmanın olduğu belirtilmiştir. Raj vd., 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada, *B. licheniformis* bakterisinin Alk1 suşundan izole edilen ksilanazın 2 saat okaliptüs siyah likörüne muamelesi sonucunda negatif kontrole kıyasla, ~%19 oranında siyah likörü degrede ettiği rapor edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, DyP-tipi peroksidazın varlığının tespit edilmesi amacıyla zimogram analizi gerçekleştirilmiştir (Mliki ve Zimmermann, 1992; Sahinkaya vd., 2018). 24. saatten itibaren *B. licheniformis* bakterisinin süpernatant ve *B. megaterium* bakterisinin pellet örneklerinde, literatürlerde rapor edildiği gibi DyP-tipi peroksidazın varlığını tayin eden koyu kırmızı-kahverengi bantların oluştuğu görüldü. Elde edilen bu sonuçlara göre *B. licheniformis* bakterisinin DyP-tipi peroksidazının hücre dışına salınan ve *B. megaterium* bakterisinin DyP-tipi peroksidazının ise hücre içi bir enzim olduğu görülmektedir. Moleküler çalışmalarla DyP-tipi peroksidaz enzimi başarılı bir şekilde klonlandı.

Sahinkaya vd.'nin 2018 yılında yayınlanan bir araştırmada *Rhodococcus* sp. T1 bakteri türüne DyP-tipi peroksidaz enzimi çalışılmıştır. DyP-tipi peroksidaz enzimine ait gen dizisi, pET28a (+) ekspresyon vektörüne klonlandıktan sonra 20°de 12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler santrifüj yardımıyla toplanmış ve sonikasyon cihazı yardımıyla patlatılarak hücredeki proteinlerin dışarıya çıkması sağlanmıştır. DyP-tipi peroksidaz enzimi iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış ve ardından karakterizasyon çalışmaları uygulanmıştır.

Santos vd.'nin 2014 yılında yayınladıkları bir makalede *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas putida* MET94 bakterilerine ait DyP-tipi peroksidaz enzimleri çalışılmıştır. DyP-tipi peroksidaz enzimine ait gen dizileri, pET21a (+) ekspresyon vektörüne

klonlanmıştır. Ekspresyonları ise, 25°'de gece boyu gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon sonrasında, hücreler santrifüj edilerek toplanmıştır ve French pres yardımıyla patlatılmıştır. AKTA saflaştırıcı yardımıyla proteinler saf halde elde edilmiştir ve karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

van Bloois vd.'nin 2010 yılında yayınlanan bir araştırmasında *Thermobifida fusca*'dan elde edilen DyP-tipi peroksidaz geni ve türevleri, pBAD/Myc-His A vektörüne klonlanmıştır. 37°C'de eksprese edildikten sonra hücreler sonikasyon ile patlatılmıştır. hücrelerdeki sitoplazmik ve periplazmik protein fraksiyonları çözünür halde elde etmek amacıyla ultrasantrifüj işlemi uygulanmıştır. Ni<sup>2+</sup>-NTA kolonu ile birlikte fraksiyonlar saf olarak elde edilmiştir ve SDS-PAGE'de görüntülenmiştir. Bu işlemin ardından enzim assay ve karakterizasyon işlemleri uygulanarak enzim ve türevleri analiz edilmiştir.

Rahmanpour vd.'nin 2016 yılında yayınladıkları bir makalede *Thermobifida fusca* bakterisinde mevcut DyP-tipi peroksidaz geninden Tat sinyal dizisi çıkartılarak ve His<sub>6</sub> füzyon proteini eklenerek pET151 ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Konak hücrede 15°C'de 16 sa. boyunca eksprese edilmiştir. Ekspresyonun ardından hücreler santrifüj edilerek toplanmış ve ardından proteinleri elde etmek için patlatılmıştır. His<sub>6</sub> füzyon proteinini diziden uzaklaştırmak için rekombinant TEV proteaz ile 16 sa. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir ve ardından Ni-NTA kolonu yardımıyla saflaştırılmıştır. Sonrasında ise karakterizasyon çalışmaları ile karakteristik özellikleri tespit edilmiştir.

İleriki çalışmalarla bu enzimlerin yüksek seviyelerde üretimi ve karakterizasyonları yapılabilir.

*Bacillus* cinsine ait olan bu bakterilerin kızılçam siyah liköründeki lignin degradasyonu ve renk giderimi sonuçları literatürlerdeki sonuçlara kıyasla oldukça düşüktür. Gerçekleştirilen bu çalışma sonuçlarına göre, DyP-tipi peroksidaz enziminin varlığının tespiti neticesinde bu organizmaların lignolitik potansiyelleri tayin edilmiştir. Bu nedenle, yüksek pH seviyelerini tolere edebildiğinden siyah likörün toksik etkilerinin gideriminde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.



## 5. SONUÇLAR

- Yapılan konsantrasyon çalışmalarıyla bu bakteriler üzerinde besiyerlerine eklenecek siyah likör konsantrasyonu %5 olarak belirlenmiştir.
- 144 saatlik süre zarfında renk ağartma deneylerinde en uygun karbon kaynağı fruktoz (%1), en uygun azot kaynağı ise pepton (%1,5) olarak bulunmuştur.
- 144 saatlik optimizasyon çalışmalarında *B. licheniformis* ve *B. megaterium* bakterileri için en iyi degridasyon için yaygın olarak 72 saat sonunda tespit edilmiştir; sırasıyla yaklaşık olarak %16 ve %11.
- Uygun koşullarda *B. licheniformis* bakterisinin yaklaşık olarak %13 oranında, *B. megaterium* bakterisinin ise yaklaşık olarak %14 oranında degridede ettiği absorbans sonuçlarına dayanarak hesaplandı.
- Zimogram analizleri sonucunda *B. licheniformis* bakterisinden elde edilen süpernatant örneklerinde ve *B. megaterium* bakterisinden elde edilen pellet örneklerinde DyP-tipi peroksidaz geninin varlığına rastlanıldı.
- DyP-tipi peroksidaz genleri tasarlanan primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan ürünler pGEM-T® Easy vektörüne klonlandı.

## 6. ÖNERİLER

Daha ileriki çalışmalarda DyP-tipi peroksidaz geninin dizi analizlerinin yapılarak pET vektör sistemlerine aktarılması, yüksek miktarlarda üretilmesi ve karakterize edilmesi önerilmektedir.

Rekombinant bakterilerden yüksek oranda elde edilecek olan enzimlerin lignin ve boya içeren, çevresel kirliliğe neden olan bazı endüstriyel atık sularda kullanılabilirliğinin araştırılması da önerilmektedir.

Gerçekleştirilen renk giderimi çalışmalarında saatler itibariyle bazı dalgalanmalar göze çarpmakta olup bu dalgalanmaların nedenlerinin araştırılması önerilmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Ahmad, M., Roberts, J. N., Hardiman, E. M., Singh, R., Eltis, L. D. ve Bugg, T. D., 2011. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase, Biochemistry, 50, 5096–5107.
- Ahmad, M., Taylor, C.R., Pink, D. ve ark., 2010. Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders, Molecular BioSystems, 6, 815–821.
- APHA, 2011. Standard methods for the examination of water and wastewaters, 21st edn. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington, DC, 981.
- Atik, C. ve Ok, K., 2017. Türkiye’de Kâğıt Üretimi ve Sürdürülebilir Kalkınma.
- Barnes C. A., Collias E. E., Felicetta V. F., Goldschmid O., Hrutfiord B. F., Livingston A., McCarthy J. L., Toombs G. L., Waldichuk M. ve Westley R., 1963. A standardized Pearl-Benson, or nitroso, method recommended for the examination of spent sulfite liquor or sulfite waste liquor concentration in waters, Tappi, 46, 347–351.
- Bergbauer, M., Eggert, C. ve Kraepelin, G., 1991. Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*, Applied Microbiology and Biotechnology, 35, 105–109.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 1–2, 248–254.
- Brink, D. P., Ravi, K., Lidén, G. ve Gorwa-Grauslund, M. F., 2019. Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database, Applied Microbiology and Biotechnology, 103, 3979–4002.
- Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M. ve Rahmanpour, R., 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi, Natural Product Reports, 28, 12, 1883–1896.
- Bugg, T. D. H., Rahmanpour, R. ve Rashid, G. M. M., 2016. Bacterial Enzymes for Lignin Oxidation and Conversion to Renewable Chemicals, Production of Biofuels and Chemicals from Lignin, Springer Singapore, 131–146.
- Chakraborty, D., Dahiya, S., Amulya, K., Srivastav, V. ve Mohan, S. V., 2019. Valorization of paper and pulp waste: Opportunities and prospects of biorefinery, Industrial and Municipal Sludge, 623-656.

- Chandra, R., Abhishek, A. ve Sankhwar, M., 2011. Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products, Bioresource Technology, 102, 6429–6436.
- Chandra, R., Raj, A., Purohit, H. J. ve Kapley, A., 2007. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste, Chemosphere, 67, 839–846.
- Chandra, R. ve Singh, R., 2012. Decolourisation and detoxification of rayon grade pulp paper mill effluent by mixed bacterial culture isolated from pulp paper mill effluent polluted site, Biochemical Engineering Journal, 61, 49–58.
- Chio, C., Sain, M. ve Qin, W., 2019. Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 107, 232–249.
- Colpa, D. I., Fraaije, M. W. ve van Bloois, E., 2014. DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 41, 1, 1–7.
- da Silva Coelho-Moreira, J., Maciel, G. M., Castoldi, R., da Silva Mariano, S., Inácio, F. D., Bracht, A. ve Peralta, R. M., 2013. Chapter 8, Involvement of Lignin-Modifying Enzymes in the Degradation of Herbicides, Agricultural and Biological Sciences Herbicides - Advances in Research, IntechOpen, 165–187.
- de Gonzalo, G., Colpa, D. I., Habib, M. H. ve Fraaije, M. W., 2016. Bacterial enzymes involved in lignin degradation, Journal of Biotechnology, 236, 110–119.
- Doble, M. ve Kumar, A., 2005. Paper and pulp biotreatment of industrial effluents, 1st ed. Elsevier, Burlington: Butterworth-Heinemann.
- Dvořák, P., Nikel, P. I., Damborský, J. ve Lorenzo, V., 2017. *Bioremediation 3.0: Engineering pollutant-removing bacteria in the times of systemic biology*, Biotechnology Advances, 35, 7, 845–866.
- EPA, 2003. Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Analytical Methods for Biological Pollutants in Ambient Water; Final Rule, 40, 136.
- Falade, A. O., Mabinya, L. V., Okoh, A. I. ve Nwodo, U. U., 2019. Biochemical and molecular characterization of a novel dye-decolourizing peroxidase from *Raoultella ornithinolytica* OKOH-1, International Journal of Biological Macromolecules, 121, 454–462.
- Gosselink, R. J. A., Abächerli, A., Semke, H., Malherbe, R., Käuper, P., Nadif, A. ve van Dam, J. E. G., 2004. Analytical protocols for characterisation of sulphur-free lignin, Industrial Crops and Products, 19, 3, 271–281.

- Gönder, Z. B., Arayıcı, S. ve Barlas, H., 2012. Treatment of pulp and paper mill wastewater using ultrafiltration process: optimization of the fouling and rejections, Industrial & Engineering Chemistry Research, 51, 17, 6184–6195.
- Guo, J., Zhao, L., Lu, W., Jia, H. ve Sun, Y., 2016. Bacterial communities in water and sediment shaped by paper mill pollution and indicated bacterial taxa in sediment in Daling River, Ecological Indicators, 60, 766–773.
- Habib, M. H., Rozeboom, H. J. ve Fraaije, M. W., 2019. Characterization of a New DyP-Peroxidase from the Alkaliphilic Cellulomonad, *Cellulomonas bogoriensis*, Molecules, 24, 7.
- Hamid, M. ve Rehman, K. 2009. Potential applications of peroxidases, Food Chemistry, 115, 4, 1177–1186.
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A. ve Paszczyński, A., 2017. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution, FEMS Microbiology Reviews, 41, 6, 941–962.
- Jongbloed, J. D., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S. ve van Dijl, J. M. 2004. Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. Molecular Microbiology, 54, 5, 1319–1325.
- Kalyani, D. C., Phugare, S. S., Shedbalkar, U. U. ve Jadhav, J. P., 2011. Purification & Characterization of a bacterial peroxidase from the isolated strains, *Pseudomonas* sp. SUK1 & its application for textile dye decolourization. Annals of Microbiology, 61, 3, 483–491.
- Kim, S. J. ve Shoda, M., 1999. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec1 involved in decolorization of dyes, Applied and Environmental Microbiology, 65, 1029–1035.
- Kirk, T. K. ve Farrell, R. L., 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin, Annual Review of Microbiology, 41, 465–505.
- Knop, D., Levinson, D., Makovitzki, A., Agami, A., Lerer, E., Mimran, A., Yarden, O. ve Hadar, Y., 2016. Limits of Versatility of Versatile Peroxidase. Applied and Environmental Microbiology, 82, 14, 4070–4080.
- Labeeuw, L., Martone, P. T., Boucher, Y. ve Case, R. J., 2015. Ancient origin of the biosynthesis of lignin precursors, Biology Direct, 10, 23.
- Leisola, M., Pastinen, O. ve Axe, D. D., 2012. Lignin—Designed Randomness, BIO-Complexity, 2012, 1–11.
- Li, J., Liu, C., Li, B., Yuan, H., Yang, J. ve Zheng, B., 2011. Identification and Molecular Characterization of a Novel DyP-Type Peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa* PKE117, Applied Biochemistry and Biotechnology, 166, 3, 774–785.

- Liu, X., Du, Q., Wang, Z., Zhu, D., Huang, Y., Li, N., Wei, T., Xu, S. ve Gu, L., 2011. Crystal structure and biochemical features of EfeB/YcdB from *Escherichia coli* O157: ASP235 plays divergent roles in different enzyme-catalyzed processes, Journal of Biological Chemistry, 286, 17, 14922–14931.
- Liu, Z. H., Le, R. K., Kosa, M., Yang, B., Yuan, J. ve Ragauskas, A. J., 2019. Identifying and creating pathways to improve biological lignin valorization, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 105, 349–362.
- Lund, M. ve Ragauskas, A. J., 2001. Enzymatic modification of Kraft lignin through oxidative coupling with watersoluble phenols, Applied Microbiology and Biotechnology, 55, 6, 699–703.
- Luria, S. E., 1984. A Slot Machine, a Broken Test Tube: An Autobiography, Harper ve Row.
- Miri, M., Ghasemian, A., Resalati, H. ve Zeinaly, F., 2015. Total Chlorine-Free Bleaching of *Populus deltoides* Kraft Pulp by Oxone, International Journal of Carbohydrate Chemistry, 5, 1–8.
- Mliki, A. ve Zimmermann, W., 1992. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from *Streptomyces cyaneus*, Applied and Environmental Microbiology, 58, 3, 916–919.
- Park, C., Lee, M., Lee, B., Kim, S-W., Chase, H. A., Lee, J. ve Kim, S., 2007. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*, Biochemical Engineering Journal, 36, 1, 59–65.
- Pearl I. A. ve Benson H. K., 1940. The determination of lignin in sulfite pulping liquors., Pap. Trade J., 111, 18, 35–36.
- Pokhrel, D. ve Viraraghavan, T., 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater—A review, Science of The Total Environment, 333, 1-3, 37–58.
- Rahmanpour R. ve Bugg T. D. H., 2015. Characterisation of Dyp-type peroxidases from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: oxidation of Mn (II) and polymeric lignin by Dyp1B, Archives of Biochemistry and Biophysics, 574, 93–98.
- Rahmanpour R., Rea, D., Jamshidi, S., Fülöp, V. ve Bugg T. D. H., 2016. Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds, Archives of Biochemistry and Biophysics, 594, 54–60.
- Raj, A., Kumar, S., Singh, S. K. ve Prakash, J., 2018. Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 15, 199–209.

- Ravichandran, P., Balaji K. ve Karthik, C., 2018. Biodegradability Studies on Pulp and Paper Mill Wastewater: A Review, International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET), 6, 4, 1956–1965.
- Roberts, J. N., Singh, R., Grigg, J. C., Murphy, M. E., Bugg, T. D. ve Eltis, L. D., 2011. Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1, Biochemistry, 50, 5108–5119.
- Sahinkaya, M., Colak, D. N., Ozer, A., Canakci, S., Deniz, I. ve Belduz, A. O., 2018. Cloning, characterization and paper pulp applications of a newly isolated DyP type peroxidase from *Rhodococcus* sp. T1, Molecular Biology Reports, 46, 1, 569–580.
- Santos, A., Mendes, S., Brissos, V. ve Martins, L. O., 2014. New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: towards biotechnological applications, Applied Microbiology and Biotechnology, 98, 5, 2053–2065.
- Sapapporn, N., Chaijamrus, S., Chatdumrong, W. ve Tochampa, W., 2019. Degradation and polymerization of black liquor lignin using *Bacillus* sp. isolated from a pulp mill, BioResources, 14, 1, 1049–1076.
- Schnell, A., Steel, P., Melcer, H., Hodson, P. V. ve Carey, J. H., 2000. Enhanced biological treatment of bleached kraft mill effluents — II. Reduction of mixed function oxygenase (MFO) induction in fish, Water Research, 34, 2, 501–509.
- Schoenherr, S., Ebrahimi, M. ve Czermak, P., 2019. Chapter 2, Lignin Degradation Processes and the Purification of Valuable Products, Lignin - Trends and Applications, Matheus Poletto, IntechOpen, 29–63.
- Sezer, M., Santos, A., Kielb, P., Pinto, T., Martins, L. O. ve Todorovic, S., 2013. Distinct structural and redox properties of the heme active site in bacterial dye decolorizing peroxidase-type peroxidases from two subfamilies: resonance Raman and electrochemical study, Biochemistry, 52, 18, 3074–3084.
- Sindhu, I., Chhibber, S. ve Capalash, N., 2006. Production of cellulase-free xylanase from *Bacillus megaterium* by solid state fermentation for biobleaching of pulp, Current Microbiology, 53, 2, 167–172.
- Singh, G., Kaur, S., Khatri, M. ve Arya, S. K., 2019. Biobleaching for pulp and paper industry in India: Emerging enzyme technology, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 17, 558–565.
- Sugano, Y., 2009. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family, Cellular and Molecular Life Sciences, 66, 8, 1387–1403.
- Sugawara, K., Nishihashi, Y., Narioka, T., Yoshida, T., Morita, M. ve Sugano, Y., 2016. Characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Streptomyces avermitilis*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 123, 4, 425–430.

- Terrett, O. M. ve Dupree, P., 2019. Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls, Current Opinion in Biotechnology, 56, 97–104.
- Thielemans, W., Can, E., Morye, S. ve Wool, R., 2002. Novel applications of lignin in composite materials, Journal of Applied Polymer Science, 83, 2, 323–331.
- Tian, B., Ji, Z. ve Chen, F., 2018. Black liquor briquettes, BioResources, 13, 1, 1801–1813.
- Tian, J. H., Pourcher, A. M., Bouchez, T., Gelhaye, E. ve Peu, P., 2014. Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes, Applied Microbiology and Biotechnology, 98, 9527–9544.
- Toczyłowska-Mamińska, R., 2017. Limits and perspectives of pulp and paper industry wastewater treatment – A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 78, 764–772.
- Toledano, A., Serrano, L., Garcia, A. ve Mondragon, I., 2010. Comparative study of lignin fractionation by ultrafiltration and selective precipitation, The Chemical Engineering Journal, 157, 1, 93–99.
- Tunay, O., Kabdasli, I., Arslan-Alaton, I. ve Olmez-Hanci, T., 2010. Chemical oxidation applications for industrial wastewaters, London: IWA Publishing.
- URL-1, 2017. FAO Statistics Division FAOSTAT. Erişime açık: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FO/visualize/> 15 Nisan 2019
- URL-2, 2017. Key Statistics 2017. CEPI-Confederation of European Paper Industries. Erişime açık: <http://www.cepi.org/statistics/keystatistics2017> 28 Ekim 2018
- URL-3, 2015. Market Outlook: Calculating the Value of Industrial Wastewater. (<https://www.waterworld.com/industrial/wastewater/article/16211380/market-outlook-calculating-the-value-of-industrial-wastewater/>)
- URL-4, 2019. Miniprep/TENS miniprep. Open Wetware. Erişime açık: [https://openwetware.org/wiki/Miniprep/TENS\\_miniprep](https://openwetware.org/wiki/Miniprep/TENS_miniprep) 23 Ocak 2019
- van Bloois, E., Torres Pazmino, D. E., Winter, R. T. ve Fraaije, M. W., 2010. A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily, Applied Microbiology and Biotechnology, 86, 1419–1430.
- Vass, K. K., Mukopadhyay, M. K., Mishra, K. ve Joshi, H. C., 1996. Respiratory stresses in fishes exposed to paper and pulp wastewater, Environment and Ecology, 14, 4, 895–897.
- Vavilala, S. L., Ghag, S. B. ve D’Souza, J. S., 2019. Lignin: Understanding and Exploring Its Potential for Biofuel Production, Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts 1<sup>ST</sup> ed., 9, 165–186.



- Verma, M. ve Ekka, A., 2018. Decolorization and Degradation of Kraft Lignin Discharged from Pulp and Paper Mill Industry by Axenic and Co-Culture of *Bacillus* sp., Research Journal of Pharmacy and Technology, 11, 10, 4386–4392.
- Vicuña, R., 1988. Bacterial degradation of lignin. Enzyme and Microbial Technology, 10, 11, 646–655.
- Wang, H., Pu, Y., Ragauskas, A. ve Yang, B., 2019. From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects, Bioresource Technology, 271, 449–461.
- Welinder, K. G., 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, Current Opinion in Structural Biology, 2, 3, 388–393.
- Weng, J. K. ve Chapple, C., 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis, New Phytologist, 187, 2, 273–285.
- Wu, Y. R. ve He, J., 2013. Characterization of anaerobic consortia coupled lignin depolymerization with biomethane generation, Bioresource Technology, 139, 5–12.
- Xiong, W., Qiu, X., Yang, D., Ruisheng, Z., Qian, Y., Li, Y., ve Wang, H., 2017. A simple one-pot method to prepare UV-absorbent lignin/silica hybrids based on alkali lignin from pulping black liquor and sodium metasilicate, Chemical Engineering Journal, 326, 803–810.
- Yadav, S. ve Chandra, R., 2015. Syntrophic co-culture of *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae* for degradation of kraft lignin discharged from rayon grade pulp industry, Journal of Environmental Science (China), 33, 229–238.
- Yang, C., Yue, F., Cui, Y., Xu, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y. ve Lü, X., 2018. Biodegradation of lignin by *Pseudomonas* sp. Q18 and the characterization of a novel bacterial DyP-type peroxidase, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 45, 10, 913–927.
- Zainith, S., Purchase, D., Saratale, G. D., Ferreira L. F. D., Bilal, M. ve Bharagava, R. N., 2019. Isolation and characterization of lignin-degrading bacterium *Bacillus aryabhatai* from pulp and paper mill wastewater and evaluation of its lignin-degrading potential, 3 Biotech, 9, 92.
- Zámocký, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Soudi, M., Pirker, K. F., Furtmüller, P. G. ve Obinger, C., 2015. Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies, Archives of Biochemistry and Biophysics, 574, 108–119.
- Zhang, L. H., Liang, R. Z., ve Song, J. T., 2012. Industrial symbiosis mode study on recycling alkaline pulping black liquor, Environmental Pollution & Control, 34, 4, 75–78.

- Zhou, C. H., Xia, X., Lin, C. X., Tong, D. S. ve Beltramini, J., 2011. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels, Chemical Society Reviews, 40, 11, 5588–5617.
- Zhu, D., Zhang, P., Xie, C., Zhang, W., Sun, J., Qian, W. J. ve Yang, B., 2017. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1, Biotechnology for Biofuels, 10, 44.
- Zimmermann, W., 1990. Degradation of lignin by bacteria, Journal of Biotechnology, 13, 119–130.
- Zubieta, C. vd., 2007a. Identification and structural characterization of heme binding in a novel dye-decolorizing peroxidase, TyrA, Proteins, 69, 2, 234–243.
- Zubieta, C. vd., 2007b. Crystal structures of two novel dye-decolorizing peroxidases reveal a beta-barrel fold with a conserved heme-binding motif, Proteins, 69, 2, 223–233.

## ÖZGEÇMİŞ

7 Nisan 1992 tarihinde Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2010-2014 yılları arasında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladı. 2015 yılının Eylül ayında ve Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI danışmanlığında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Nisan 2019'dan itibaren Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.